

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Efectos de componentes del lumen intestinal sobre células de adenocarcinoma de colon humano. Apoptosis inducida por ácidos biliares y regulación de la transcripción génica por butirato

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Ignacio Barrasa López

Directores

M^a Antonia Lizarbe Iracheta
Nieves Olmo López
Javier Turnay Abad

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**EFFECTO DE COMPONENTES DEL LUMEN
INTESTINAL SOBRE CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO.
APOPTOSIS INDUCIDA POR ÁCIDOS BILIARES
Y REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN
GÉNICA POR BUTIRATO**

JUAN IGNACIO BARRASA LÓPEZ

MADRID, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**EFFECTO DE COMPONENTES DEL LUMEN
INTESTINAL SOBRE CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO.
APOPTOSIS INDUCIDA POR ÁCIDOS BILIARES
Y REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN
GÉNICA POR BUTIRATO**

DIRECTORES: Dra. M^a ANTONIA LIZARBE IRACHETA
Dra. NIEVES OLMO LÓPEZ
Dr. JAVIER TURNAY ABAD

TESIS DOCTORAL

JUAN IGNACIO BARRASA LÓPEZ

MADRID, 2012

A mis padres

Esta investigación se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. M^a Antonia Lizarbe Iracheta, la Dra. Nieves Olmo López y el Dr. Javier Turnay Abad. Quisiera agradecerles su ayuda incondicional y su gran dedicación, tanto a nivel investigador como docente. Gracias también al Dr. José G. Gavilanes Franco, quien me dio la oportunidad de incorporarme a este Departamento.

Quisiera también dar las gracias al Dr. Simon Cook por permitirme trabajar durante unos meses en su grupo de investigación, así como a los grandes amigos que hice durante mi estancia en Cambridge (Cris, Manuel, Elena, Sandra, Seb, Arnold, Barbara...). Por supuesto, gracias a todos mis compañeros de Departamento por hacer del día a día algo mucho más sencillo. En especial, quiero dar las gracias al Dr. Emilio Lecona, con quien di mis primeros pasos en la investigación, y que tanto tiempo y paciencia me dedicó.

Pero no puedo tampoco dejar de dar las gracias a todos aquellos que, aun no perteneciendo al ámbito científico, han estado a mi lado para lo bueno y lo malo. Gracias a Javi y Dolores, grandes amigos y los mejores compañeros de carrera. Gracias también a los “Beholders” (Ron, J.L., Juanma, Dani, Raúl...), con quienes sigo haciendo las mismas cosas que hace 14 años. Un agradecimiento muy especial para D. Francisco Abajo y Miguel Ureña, que desde mi llegada a Madrid han sido como un padre y un hermano para mí. No puedo dejar de mencionar a José Luis Noeda, cuyas enseñanzas me abrieron un nuevo camino, y a Amal, un rayo de color que llegó de improviso. Gracias también a todos mis amigos de Talavera (Javi, Lau, Mer, Rebe, Robe, Seke, You...), quienes a estas alturas no sé si tienen claro que no soy médico... Gracias por tener una palabra de aliento en cada una de mis batallas perdidas.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia. A mi hermana y sobrinos, quienes estando tan lejos, siento tan cerca. A mi abuela, que tanto esperaba este momento. Y a mis padres, por su apoyo incondicional, por la educación que me han regalado, y por enseñarme el valor del esfuerzo y el trabajo. A ellos van dedicadas las siguientes páginas.

ABREVIATURAS

Apaf	<i>Apoptosis protease-activating factor</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
CA	Ácido cólico
CDCA	Ácido quenodesoxicólico
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CIMP	Fenotipo hipermetilador de islas CpG
CIN	Inestabilidad cromosómica
COX	Ciclooxigenasa
DCA	Ácido desoxicólico
DCC	<i>Deleted in colorectal cancer</i>
DCFH	2',7'-diclorfluorescein-diacetato
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminiscense</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ERK	Quinasas reguladas extracelularmente
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPR	Receptor de péptidos formilados
FXR	Receptor X farnesoide
GADD153	<i>Growth arrest- and DNA damage inducible gene 153</i>
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GSK3 β	Glucógeno sintasa quinasa-3 β
GTP	Guanosina trifosfato
HAT	Histona acetil transferasa
HDAC	Histona desacetilasa
IGF	Factor de crecimiento de tipo insulina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LCA	Ácido litocólico
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein kinase</i>

Mcl-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MCT	Transportador de monocarboxilatos
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
MMR	<i>Mutation Mismatch Repair</i>
MPT	Transición de permeabilidad mitocondrial
MSI	Inestabilidad de microsatélites
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Tampón fosfato salino sin iones calcio y magnesio
PC	Fosfatidilcolina
PG	Fosfatidilglicerol
PKC	Proteína quinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PS	Fosfadilserina
PXR	Receptor X de pregnano
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBS	Tampón Tris salino
TE	Tris-EDTA
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSA	Tricostatina A
UDCA	Ácido ursodesoxicólico
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VDR	Receptor de vitamina D
ZBP89	<i>Zinc-finger binding protein-89</i>

SUMMARY

Environmental factors are strongly involved in the development of colon cancer. Among them, diet and nutritional habits constitute the most determinant causes in the appearance of sporadic colorectal cancer. The continuous exposure to high concentrations of bile acids in individuals with a fat-rich diet leads to DNA damage and may allow selective growth of cells resistant to the cytotoxic effects of these agents, increasing the risk of tumor development. In this regard, we have studied the effect of DCA and CDCA treatments in butyrate-sensitive BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells, as well as in butyrate-resistant BCS-TC2.BR2 cells. We have confirmed that these bile acids promote cell death in both cell lines, being this effect stronger in BCS-TC2 cells. DCA and CDCA trigger apoptosis after short treatment times (< 2h), as observed by several characteristic apoptotic features, such as cell detachment, internucleosomal DNA degradation, caspase activation and loss of membrane asymmetry. We have confirmed that these events occur in BCS-TC2 cells through the activation of different membrane-associated enzymes [NAD(P)H oxidases and PLA2] which leads to an increase of reactive oxygen species that eventually triggers the mitochondrial apoptotic pathway. The activation of caspase-3 by the apoptosome activates Bax via cleavage of Bcl-2, thus generating a feedback loop that amplifies the apoptotic signal.

On the other hand, we have observed that the mechanisms of apoptosis triggered by bile acids in butyrate-resistant cells are similar to that observed in butyrate-sensitive cells. However, BCS-TC2.BR2 cells express higher levels of the antiapoptotic protein Bcl-2 that prevent the activation of Bax. Thus, resistant cells overcome the proapoptotic feedback loop observed in BCS-TC2 cells. After activation of the intrinsic apoptotic program by oxidative stress, caspase-3 is not able to degrade enough Bcl-2 protein to allow the release of Bax, the formation of Bax-dependent pores in the mitochondrial membrane and the subsequent release of proapoptotic factors. Moreover, we have demonstrated that this resistance can be reverted *in vitro* by the use of the Bcl-2 inhibitor ABT-263, suggesting that acquisition of resistance to several drugs used in colorectal carcinoma treatments, such as the clinically used derivatives of butyrate or other histone deacetylase inhibitors, could be potentially reverted by oral

coadministration with the Bcl-2 inhibitor ABT-263 in patients with tumors where elevated levels of this protein are detected.

Taking advantage of this cell model, we have also analyzed the effects of butyrate on gene expression. This short-chain fatty acid is a well-known histone deacetylase inhibitor, and its ability to control the transcriptional activity has been related with an increase in the acetylation status of histones and other non-histone proteins, including several transcription factors. We have confirmed that butyrate treatment modifies the gene expression profile of BCS-TC2 cells, affecting around 150 genes. Thus, we focused our work in the analysis of some of these gene products, among them annexin A1 and MMP-11, trying to understand the molecular mechanisms that underlay this transcriptional regulation.

We have observed that butyrate increases annexin A1 expression in BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells. Although BCS-TC2.BR2 are resistant to the apoptotic effects of butyrate, they are sensitive to differentiation induction by this agent, a process that involves annexin A1 expression regulation. We have confirmed that p53 is essential for basal promoter activity. Annexin A1 protein levels increase along cell differentiation due to histone deacetylase inhibition, as trichostatin A (a different histone deacetylase inhibitor) displays a similar effect. Induction is exerted at a transcriptional level through p53 and CCAAT boxes on the annexin A1 promoter. Butyrate treatment strongly impairs the binding of NF-YA to annexin A1 promoter, either directly through the CCAAT box or through complexes with p53. This event prevents the inhibitory effects of NF-YA and allows the entrance of other transcriptional activators to this CCAAT box. Moreover, annexin A1 expression induction is the consequence of p38-MAPK activation, and blockage of this pathway prevents promoter activation by butyrate.

Other members of the annexin family of proteins, as Annexin A5, alter their expression or secretion levels after butyrate treatment. As secretion requires vesicle aggregation, we have analysed the key role of the N-terminus of this protein in this process taking advantage of the fact that human annexin A5 does not aggregate vesicles whereas its chicken ortholog does.

We have also studied the transcriptional regulation of MMP-11 (stromelysin-3), being this the first time that the expression of this enzyme has been reported in human colon adenocarcinoma cells. Butyrate treatment increases MMP-11 protein levels in

conditioned media of BCS-TC2 cells, but not significantly in that of BCS-TC2.BR2 cells. We have confirmed that Sp1 is essential for basal promoter activity of this gene through its binding to several GC boxes. Induction of gene expression by butyrate is the consequence of an increase in the acetylation status of Smad2. Acetylation of this transcription factor promotes the formation of Sp1/Smad complexes, leading to the activation of MMP-11 promoter. Moreover, we have confirmed that this induction is the consequence of ERK1/2-MAPK activation, as blockage of this activation pathway prevents promoter activation by butyrate.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Epitelio colónico, cáncer colorrectal y factores ambientales	4
1.1.1. El epitelio colónico	4
1.1.2. Cáncer colorrectal y factores ambientales	6
1.2. Ácidos biliares	10
1.2.1. Síntesis y fisiología de los ácidos biliares	11
1.2.2. Ácidos biliares y señalización celular en células de colon	16
1.2.3. Estrés oxidativo	19
1.2.4. El daño en el DNA y la proteína p53	21
1.2.5. Ácidos biliares como agentes carcinogénicos en colon	22
1.3. Apoptosis	24
1.3.1. Ruta extrínseca o mediada por receptor	25
1.3.2. Ruta intrínseca o mitocondrial	27
1.3.3. Ruta de retículo endoplásmico	29
1.4. El Butirato	30
1.4.1. Síntesis y fisiología	30
1.4.2. Actividad de histona desacetilasa	33
1.4.2.1. <i>Inhibición de la actividad HDAC</i>	35
1.4.2.2. <i>Regulación de la expresión génica por inhibidores de HDAC</i>	37
1.4.2.3. <i>Acetilación de proteínas no histonas</i>	39
1.5. Metaloproteinasas de la matriz	41
1.5.1. MMP-11 (Estromalisina-3)	45
1.6. Anexinas	48
1.6.1. Anexina A1	51
1.6.2. Anexina A5	56

2. OBJETIVOS	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1. Técnicas generales de cultivo celular	66
3.1.1. Cultivo celular y subcultivo	66
3.1.2. Líneas celulares empleadas	67
3.1.3. Tratamientos	67
3.2. Técnicas generales para el análisis de proteínas y ácidos nucleicos	68
3.2.1. Obtención de extractos proteicos	68
3.2.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección	69
3.2.3. Inmunoprecipitación de proteínas	70
3.2.4. RT-PCR (<i>Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction</i>)	73
3.2.5. <i>Arrays</i> de cDNA	73
3.3. Ensayos de proliferación, diferenciación y apoptosis	74
3.3.1. Ensayos de viabilidad celular	74
3.3.2. Valoración de la actividad de fosfatasa alcalina	74
3.3.3. Citometría de flujo	75
3.3.4. Valoración de la actividad de lactato deshidrogenasa	76
3.3.5. Fragmentación de DNA genómico	76
3.3.6. Determinación fluorimétrica de especies reactivas de oxígeno	76
3.3.7. Actividad de caspasas	77
3.3.8. Ensayo de activación de Bax	77
3.4. Análisis de promotores.....	78
3.4.1. Ensayos de transfección y luciferasa	78
3.4.2. Ensayos de retardo en gel (EMSA; <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>) y Superretardo (<i>Supershift</i>)	80
3.4.3. Inmunoprecipitación de cromatina (<i>ChIP</i>)	82
3.5. Expresión, purificación y caracterización de la anexina A5	84
3.5.1. Expresión y purificación	84
3.5.2. Caracterización estructural y funcional	85

4. RESULTADOS	87
4.1. Apoptosis inducida por ácidos biliares	89
4.1.1. Mecanismos de apoptosis inducidos por DCA y CDCA	89
4.1.2. Protección frente a la apoptosis inducida por ácidos biliares en células resistentes a butirato	105
4.1.3. Revisión bibliográfica: <i>Bile acids, from healthy to cytotoxic molecules</i>	121
4.2. Efecto del butirato en células de adenocarcinoma de colon humano	145
4.2.1. Modelos de estudio para el efecto del butirato	145
4.2.2. Mecanismos de regulación del promotor de la anexina A1 por butirato	157
4.2.3. Papel de la región N-terminal de la anexina A5 en la agregación de vesículas	169
4.2.4. Regulación del promotor de la MMP-11 por butirato	183
4.2.5. Resultados adicionales	197
5. DISCUSIÓN	205
5.1. Apoptosis inducida por ácidos biliares	207
5.2. Efecto del butirato en células de adenocarcinoma de colon humano	213
6. CONCLUSIONES	227
7. ANEXO I	231
8. BIBLIOGRAFÍA	243

1. INTRODUCCIÓN

El balance entre proliferación celular y apoptosis es uno de los principales mecanismos de regulación para el correcto mantenimiento de la homeostasis de los organismos. La pérdida de este equilibrio puede provocar la expansión clonal de un grupo de células de manera que se multipliquen de forma descontrolada, dando lugar a la formación de una masa tumoral. Este proceso, conocido como **carcinogénesis**, tiene un origen multifactorial y suele ser el resultado de diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la célula de modo secuencial hacia una transformación maligna. En fases avanzadas de la enfermedad, y en función de su capacidad invasiva, estas células tumorales pueden alcanzar el torrente sanguíneo o el sistema linfático y llegar a colonizar otros tejidos, dando lugar al proceso conocido como **metástasis**.

El inicio de la carcinogénesis suele ser el resultado de alteraciones en el DNA como consecuencia de la exposición a diferentes agentes procarcinogénicos, o bien por una predisposición genética del individuo. Estas modificaciones en la secuencia o la estructura del DNA pueden afectar a dos grupos principales de genes: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores, ambos encargados de la expresión de proteínas esenciales en el proceso de regulación de la proliferación y muerte celular. Generalmente éste es un proceso multisecuencial debido a la sucesiva acumulación de mutaciones y modificaciones epigenéticas a lo largo de los años. En este sentido, los factores ambientales suponen un elemento esencial en la aparición de tumores dado que numerosos estímulos extracelulares, como agentes químicos, radiación ultravioleta, o infecciones por virus o bacterias, pueden provocar alteraciones en el DNA actuando como factores procarcinogénicos. Este hecho es especialmente importante en órganos o tejidos que se encuentran en constante renovación celular, como ocurre en el epitelio intestinal. En ocasiones las células alteradas no sólo presentan una desregulación en su programa de muerte celular, sino que incluso llegan a adquirir resistencia a estímulos apoptóticos. Esta circunstancia puede favorecer la selección de una población de células alteradas, incrementándose así la posibilidad de desarrollar tumores. Por consiguiente, conocer los mecanismos implicados tanto en el proceso carcinogénico como en la adquisición de resistencia a estímulos apoptóticos, es esencial no sólo para la prevención, sino también para el diseño de tratamientos efectivos contra el cáncer.

1.1. EPITELIO COLÓNICO, CÁNCER COLORRECTAL Y FACTORES AMBIENTALES.

1.1.1. El epitelio colónico

El proceso completo de la digestión de alimentos se desarrolla en cuatro etapas: la ingestión, la digestión como tal, la absorción y la excreción. Cada uno de estos procesos se lleva a cabo en estructuras especializadas que, en su conjunto, conforman el sistema digestivo (Figura 1). Los nutrientes que han sido procesados en el estómago pasan al intestino delgado y, posteriormente, al grueso. La función principal del intestino delgado es la de transportar y mezclar todos los contenidos presentes en el lumen intestinal, así como producir enzimas y otros compuestos esenciales para una correcta digestión y absorción de los nutrientes. La que desempeña el intestino grueso es la de absorber agua y otras sustancias, mantener la osmolaridad de la sangre controlando los niveles de electrolitos, y almacenar las sustancias de desecho en forma de heces hasta que puedan ser eliminadas. Además, el colon posee una flora bacteriana anaerobia capaz de fermentar diferentes componentes de la dieta y que también participa en la síntesis de algunos compuestos fundamentales para diversas funciones metabólicas.

El intestino, al igual que cualquier otro órgano del cuerpo humano, necesita estructuras especializadas para poder llevar a cabo todas sus funciones fisiológicas. De este modo, el intestino delgado tiene las válvulas conniventes o pliegues de Kerckring que, junto a los pliegues de la propia mucosa a modo de vellosidades y el borde en cepillo (o microvellosidades) de las células epiteliales, permiten multiplicar de forma extraordinaria la superficie absorptiva. Pero, dado que el intestino grueso básicamente absorbe agua y algunas otras pocas sustancias sencillas, carece de parte de estas estructuras, estando constituido por una única capa de células epiteliales situada sobre la lámina propia, y se organiza formando unas invaginaciones denominadas criptas. Estas estructuras constituyen la unidad básica funcional del colon. Aproximadamente la mitad superior de las criptas está revestida por un epitelio cilíndrico que contiene colonocitos (células absorptivas) y células caliciformes mientras que, en la mitad inferior, las células se encuentran menos diferenciadas, existiendo un grupo de células madre que, a través de sucesivas divisiones asimétricas, se encargan de asegurar la renovación del epitelio. Diseminadas a lo largo del fondo de estas criptas también se localizan las células

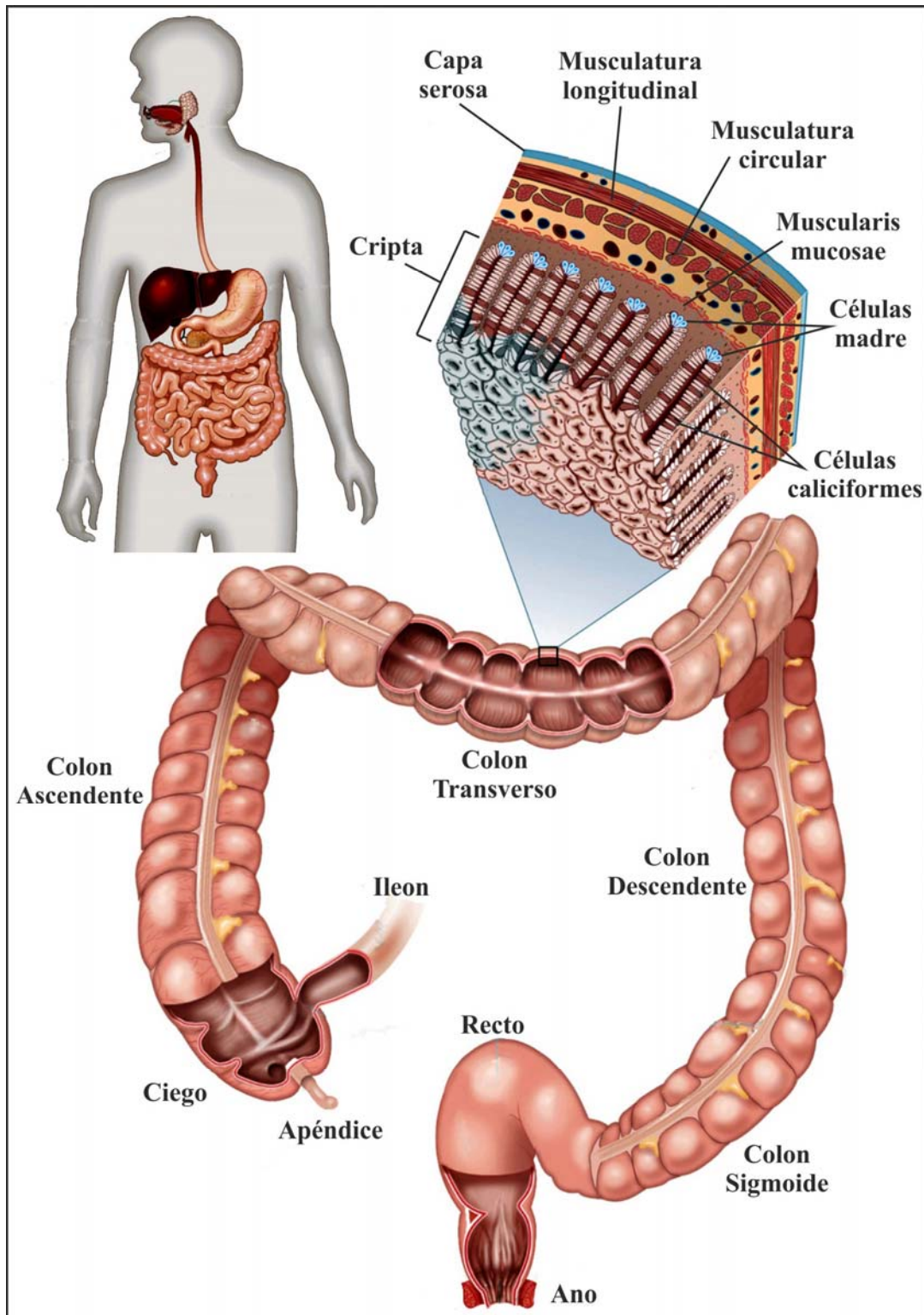


Figura 1. Estructura del colon humano.

Se representa la estructura del sistema digestivo humano, centrándose en la región correspondiente al intestino grueso e identificando sus diferentes tramos. En conjunto, la longitud de los intestinos es de alrededor de 8-9 metros, plegándose de forma repetida para poder ajustarse al tamaño de la cavidad abdominal. El intestino grueso es bastante más corto que el delgado, y se sitúa alrededor de este en cuatro secciones: el colon ascendente, transverso, descendente y sigmoide. Se muestra ampliada una sección del colon donde puede apreciarse la organización en forma de criptas, indicándose cada uno de sus componentes (imágenes modificadas de la Encyclopaedia Britannica).

enteroendocrinas capaces de secretar el enteroglucagón y el péptido intestinal vasoactivo. Los colonocitos representan el tipo celular predominante en la mucosa y su función es la de absorber agua, electrolitos y otras moléculas de pequeño tamaño como ácidos grasos de cadena corta (SCFA; *short chain fatty acids*). Las células caliciformes son glándulas unicelulares secretoras de moco que están distribuidas de forma difusa entre los colonocitos. Su secreción mucosa forma una capa sobre la superficie del epitelio que lo protege de la abrasión e impide la adherencia e invasión de bacterias patógenas.

El epitelio colónico se renueva continuamente a través de las células madre presentes en la base de las criptas, por migración de su progenie hacia la superficie y exfoliación de las células muertas. La división de las células madre es asimétrica, de tal forma que una de las células de la progenie mantiene su fenotipo de célula madre mientras que la otra se diferencia en otro tipo celular (van der Flier y Clevers, 2009). Este proceso de diferenciación ocurre a medida que las células ascienden hacia la superficie de la cripta, y está determinado por la participación de numerosos factores como productos de la dieta y sustancias de naturaleza autocrina. Una vez alcanzada la superficie apical de las criptas, los colonocitos más envejecidos son eliminados a través de dos mecanismos: por exfoliación provocada por el paso del contenido luminal y, principalmente, por activación del programa apoptótico y posterior asimilación de los productos de desecho por colonocitos adyacentes o por macrófagos subepiteliales (Loktionov, 2007).

1.1.2. Cáncer colorrectal y factores ambientales.

El cáncer colorrectal es, a nivel mundial, el tercer tipo de cáncer más diagnosticado en varones y el segundo en mujeres. Constituye la cuarta causa de muerte más común por cáncer en el mundo, con alrededor de 600.000 muertes anuales (Jemal et al., 2011). A pesar de la enorme variedad de tipos celulares presentes en el organismo, un alto porcentaje de las neoplasias tienen su origen en células epiteliales. Esto se debe a dos características principales que pueden favorecer el proceso carcinogénico. En primer lugar, las células epiteliales suelen mantener durante un largo período de tiempo su capacidad de división debido, generalmente, a que se encuentran sometidas a procesos de constante renovación tisular. En segundo lugar, al comportarse como una barrera física protectora, estas células se localizan en las regiones más

externas de órganos y tejidos donde se encuentran directamente expuestas a agentes potencialmente carcinogénicos. Esta última circunstancia es de especial importancia en el epitelio colónico debido a su función fisiológica. Tanto los nutrientes como el agua se van absorbiendo a lo largo del tracto digestivo, por lo que la concentración de sustancias potencialmente perjudiciales se incrementa en los últimos tramos. Además, estas se acumulan hasta su expulsión en las heces, aumentando así el tiempo de exposición a las mismas. Por tanto, las características específicas de cada órgano y tejido, tanto a nivel estructural como fisiológico, son fundamentales a la hora de comprender el proceso de transformación tumoral.

La carcinogénesis colorrectal presenta un fuerte componente genético, hecho más que evidente en los casos derivados de síndromes hereditarios (ver Anexo 1). Pero otro de los elementos esenciales en el desarrollo de adenocarcinomas de colon es el ambiente, que viene principalmente determinado por dos factores: el estilo de vida y, sobre todo, la dieta. Dentro del estilo de vida, numerosos estudios han analizado diferentes parámetros y su posible correlación con el desarrollo e índice de mortalidad en cánceres colorrectales (Ahmed, 2004; Khan y col., 2010). Varios de los factores que se han correlacionado con un aumento en el riesgo de padecer esta enfermedad son, por ejemplo, la ingesta elevada de alcohol, que suele estar asociada con otros hábitos o comportamientos que predisponen para esta enfermedad, como fumar, una baja actividad física o una dieta poco equilibrada (Fedirko y col., 2011). En este sentido, se ha comprobado que una actividad física intensa reduce el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal. Este efecto beneficioso se explica por el mantenimiento del balance energético, la mejora del sistema inmune, la estimulación del movimiento del contenido colónico, o la regulación de los niveles de insulina y prostaglandinas (Slattery y col., 2003).

Sin duda, el factor ambiental más determinante en la aparición de cáncer colorrectal es la dieta. Durante siglos se ha estudiado la relación entre salud y hábitos alimenticios, pudiendo afirmarse actualmente que la dieta es una de las mayores fuentes de exposición a carcinógenos medioambientales. Una de las razones principales por las que se ha despertado un gran interés acerca de la relación entre cáncer y dieta ha sido la observación en numerosos estudios de las importantes diferencias en tasas de incidencia de tumores específicos entre distintos países y entre poblaciones sometidas a diferentes costumbres nutricionales (Jemal y col., 2011). Actualmente se considera que las dietas

hipercalóricas, o ricas en grasas, incrementan el riesgo de sufrir cáncer colorrectal, mientras que ciertos productos, como la fibra, el calcio o la vitamina D, parecen tener un importante efecto protector antitumoral (Azcarate-Peril y col., 2011).

Directamente relacionada con las dietas hipercalóricas está la obesidad, que no es más que el resultado de un desequilibrio entre ingreso y gasto de energía en el organismo, de modo que se genera un balance positivo que se traduce en un aumento de la masa corporal. Este desequilibrio provoca varios desajustes metabólicos relacionados con la carcinogénesis colorrectal, como el desarrollo de la resistencia a insulina e hiperinsulinemia (Johnson y Lund, 2007). Se ha comprobado que la insulina estimula la proliferación y reduce la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon, promoviendo el crecimiento de tumores colorrectales en modelos animales (Kominou y col., 2003). En un estado de hiperinsulinemia aumentan los niveles de IGF-1 (*Insulin Growth Factor I*) libre. El colon expresa receptores para IGF de forma que su activación provoca la inhibición de la apoptosis en colonocitos, lo que puede traducirse en un fenómeno de expansión clonal de las células epiteliales colónicas (Durai y col., 2005). Finalmente, la obesidad también se ha asociado con un estado de inflamación crónica inducida por una producción excesiva de reservas lipídicas y niveles altos de glucosa circulante, lo que parece constituir otro factor promotor del desarrollo de tumores colónicos (Gunter y Leitzmann, 2006).

Cada vez es más evidente la correlación positiva entre una *ingesta rica en grasas* y una mayor incidencia de cáncer de colon (Butler y col., 2009; Bernstein y col., 2011). En este sentido, una dieta con gran contenido en grasas saturadas se ha asociado con niveles elevados de ácidos biliares en el lumen colónico (Reddy, 1980, 1981). Esta exposición a concentraciones elevadas de ácidos biliares acarrea dos consecuencias importantes. En primer lugar, los ácidos biliares promueven daños en el DNA, principalmente por estrés oxidativo, de modo que se comportan como mutágenos provocando la expresión aberrante de oncogenes y genes supresores de tumores (Rosignoli y col., 2008). En segundo lugar, la exposición continua a altos niveles de ácidos biliares podría permitir el crecimiento selectivo de una población de células resistentes a sus efectos apoptóticos (Bernstein y col., 2004; Powell y col., 2006). Dadas estas circunstancias, junto con diferentes observaciones que correlacionan los altos niveles de ácidos biliares con incrementos en la incidencia de cáncer de colon, podemos considerar a estos agentes como factores procarcinogénicos en el desarrollo de cáncer colorrectal (Debruyne y col., 2001; Bernstein y col., 2005; Bernstein y col., 2011).

Por el contrario, una *dieta rica en fibra* ejerce un efecto protector frente al desarrollo de tumores colorrectales (Johnson y Lund, 2007; Kim y Milner, 2007). La fibra de la dieta se define como el conjunto de hidratos de carbono no digeribles presentes de forma intrínseca en los vegetales (Lupton, 2004). Uno de los mecanismos fundamentales en el papel carcinoprotector de la fibra es el incremento en la estructuración de las heces con la mejora de la motilidad intestinal, lo que disminuye la exposición a carcinógenos presentes en la dieta. Pero, debido a la ausencia en humanos de enzimas capaces de degradar la fibra, prácticamente el 100% de ésta llega hasta el colon, de modo que la microflora allí presente se encarga de captar parte de esa fibra y llevar a cabo su fermentación anaerobia (Davis y Milner, 2009). Los productos derivados de la fermentación de la fibra son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis y el funcionamiento del tracto gastrointestinal. En este sentido, se ha propuesto que la microflora intestinal promueve una especie de estado estacionario a través de su actividad fermentativa, ya que los productos finales del metabolismo de hidratos de carbono (como el butirato, acetato y propionato) ejercen un efecto beneficioso, mientras que los productos del metabolismo de las proteínas (como los compuestos fenólicos, aminos, amoníaco e indoles) son perjudiciales para el tracto gastrointestinal (Davis y Milner, 2009; Azcarate-Peril y col., 2011).

De especial relevancia es el efecto protector frente al desarrollo de cáncer colorrectal de los SCFA generados por la fermentación de la fibra, especialmente el butirato. En primer lugar, hay que considerar que el butirato constituye la principal fuente de energía de los colonocitos (Roediger, 1982) y ejerce un papel fundamental en la regulación de su proliferación, diferenciación y apoptosis. Además desempeña otras funciones beneficiosas sobre la mucosa colónica, como disminuir el estrés oxidativo o inhibir los procesos inflamatorios (Hamer y col., 2008). En relación al cáncer colorrectal se ha descrito que mientras que el butirato ejerce un efecto antiproliferativo sobre células tumorales, no parece tener ninguna consecuencia sobre el crecimiento del epitelio colónico sano (Comalada y col., 2006). Los efectos diferenciadores y proapoptóticos del butirato sobre diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal han sido ampliamente demostrados *in vitro* (Pajak y col., 2007). En este sentido se ha comprobado que el butirato es capaz de modificar el perfil de expresión génica de la mucosa colónica *in vivo* (Vanhoutvin y col., 2009), así como el de células de adenocarcinoma de colon *in vitro* (Olmo y col., 2007). Estas observaciones han generado un gran interés por el butirato como agente protector frente al cáncer

colorrectal y, no en vano, derivados de este agente se encuentran actualmente en fase clínica para el tratamiento de diferentes tipos de tumores (Ma y col., 2009).

Existen otros componentes de la dieta para los que se ha descrito un efecto antitumoral por su efecto proapoptótico, como son los productos de fermentación de la leche y los ácidos grasos n-3 poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados son esenciales para el sistema inmune actuando como precursores de la síntesis de eicosanoides. Una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados disminuye la actividad de las enzimas responsables de la formación de ácidos biliares secundarios, compuestos descritos como agentes promotores de tumores. Los ácidos grasos n-3 poliinsaturados disminuyen la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA₂; *Phospholipase A2*), fosfolipasa C (PLC; *Phospholipase C*) y ciclo-oxigenasa 2 (COX-2; *Cyclooxygenase 2*) en los colonocitos. Ello conlleva una menor disponibilidad de ácido araquidónico que se traduce en una disminución en la producción de prostaglandina E2, considerada como agente promotor de tumores de colon (Hardman, 2004).

Otro componente de la dieta que tiene un efecto quimiopreventivo es la vitamina D debido a su actividad antiproliferativa y diferenciadora. La vitamina D es una hormona esteroidea que actúa como factor de transcripción uniéndose a receptores nucleares. Entre las dianas de la vitamina D se encuentran genes implicados en proliferación y regulación del ciclo celular como *p21*, *p27^{Kip1}* y *TGF-β* (*Transforming growth factor-β*) (Harris y Go, 2004). Finalmente cabe destacar también el papel del folato como agente protector frente a tumores. Este es esencial para la síntesis, estabilidad e integridad del DNA, y modula la metilación de secuencias génicas. La deficiencia de folato se ha asociado con roturas de hebras de DNA, metilaciones aberrantes, reparación errónea del DNA y un incremento en la tasa de mutaciones. Por estas razones el folato ha sido descrito como un importante agente quimioprotector de los tumores colorrectales, así como un importante suplemento alimenticio capaz de revertir los efectos adversos asociados con la edad que se relacionan con la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas a lo largo de la vida del individuo (Jang y col., 2005; Johnson y Lund, 2007).

1.2. ÁCIDOS BILIARES

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas que actúan como detergentes fisiológicos en el organismo y cuya función principal es la de facilitar el transporte y la

absorción de las grasas de la dieta. Su actividad no queda únicamente limitada a la asimilación de nutrientes, sino que ejercen numerosas funciones, como facilitar la absorción de calcio, actuar como agentes antimicrobianos, modular la liberación de diferentes enzimas digestivas, activar rutas de señalización celular o modificar la transcripción génica. Por tanto, alteraciones en su síntesis, transformación o transporte se traducen en desórdenes metabólicos en ocasiones muy graves. Todas estas observaciones hacen de los ácidos biliares unas dianas de estudio interesantes para la prevención y el desarrollo de terapias frente a diferentes enfermedades.

1.2.1. Síntesis y fisiología de los ácidos biliares

Los ácidos biliares constituyen una gran familia de esteroides derivados del colesterol. Su síntesis implica numerosas etapas que, en su mayoría, tienen lugar en el hígado. Estructuralmente todos ellos se caracterizan por presentar un núcleo esteroídico formado por tres anillos de seis átomos de carbono (denominados A, B y C) y un anillo de cinco (denominado D), además de una cadena lateral con un grupo carboxilo capaz de formar enlaces de tipo amida con glicocola y taurina para dar lugar a las sales biliares conjugadas. La principal característica del núcleo esteroídico es que puede hidroxilarse en diferentes carbonos, que en humanos corresponden a las posiciones C₃, C₇ y C₁₂. Dichas características estructurales y físico-químicas son las que proporcionan la naturaleza anfipática a estas moléculas, puesto que los grupos hidroxilo generan una región hifrofílica mientras que la cadena lateral de carbonos se comporta de manera hidrofóbica. Es precisamente esta naturaleza anfipática la responsable de la principal actividad biológica de los ácidos biliares, que no es otra que emulsionar las grasas en el tracto digestivo.

El hígado humano sintetiza diariamente entre 0,2 y 0,6 gramos de ácidos biliares. Se conocen dos rutas principales de síntesis, siendo el metabolito inicial en ambos casos el colesterol. La ruta principal o mayoritaria es la conocida como “ruta clásica” o “ruta neutra” dado que sus metabolitos intermedios tienen carga neutra (Figura 2). Este proceso ocurre en el hígado y da lugar a los ácidos biliares primarios cólico (CA, *Cholic Acid*) y quenodesoxicólico (CDCA, *Chenodeoxycholic Acid*). En un primer paso, el colesterol sufre una 7- α -hidroxilación para dar lugar al 7- α -hidroxicolesterol. A esta modificación inicial le sigue toda una cascada de reacciones

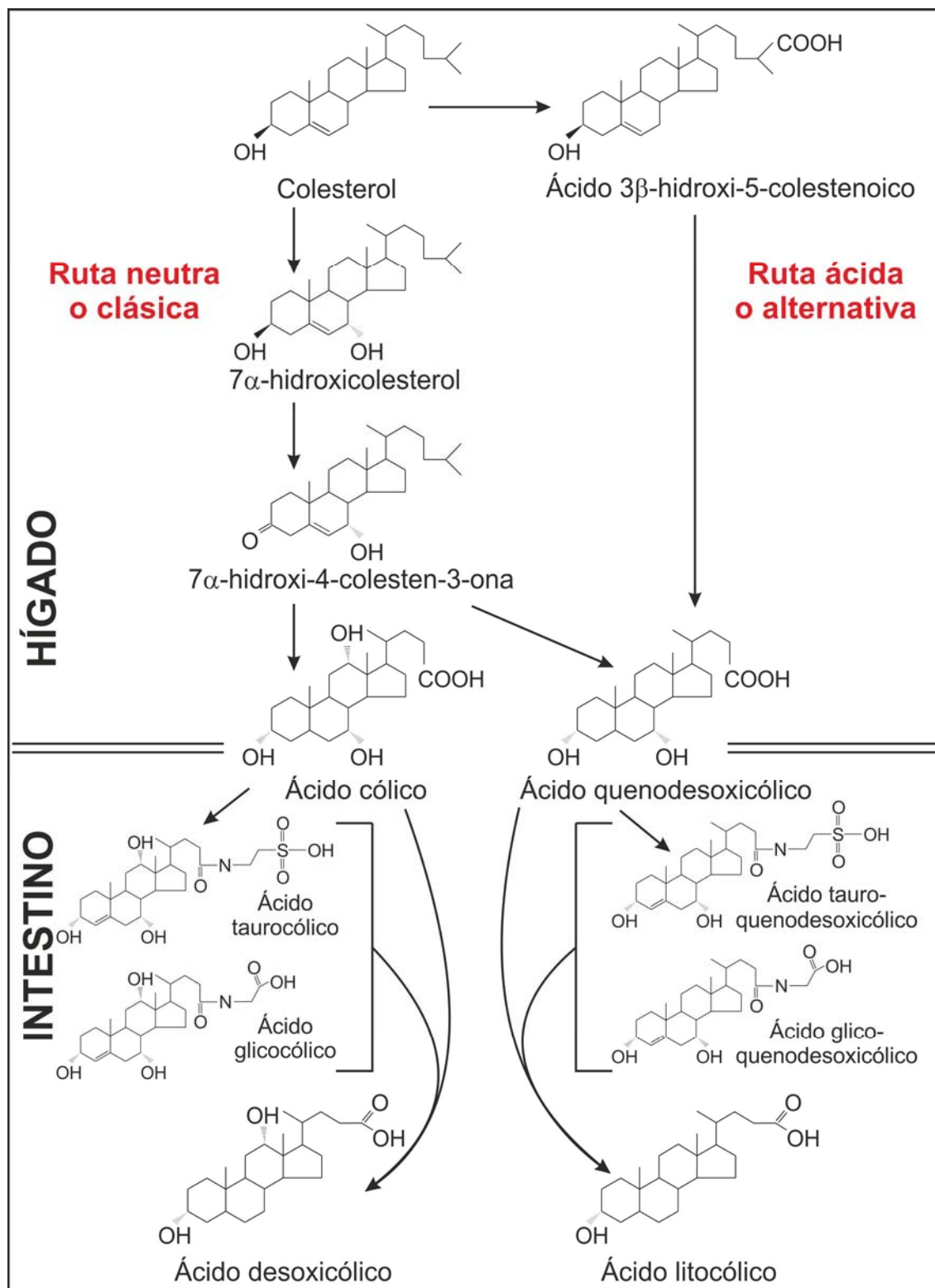


Figura 2. Síntesis de ácidos biliares

Se recogen los productos principales de la ruta de síntesis de ácidos biliares a partir del colesterol. A través de la ruta clásica se obtienen los ácidos biliares primarios cólico (CA) y quenodesoxicólico (CDCA), mientras que la ruta ácida sólo da lugar a este último. Ambos pueden conjugarse con glicocola o con taurina para dar lugar a las correspondientes sales biliares. Los ácidos biliares secundarios desoxicólico (DCA) y litocólico (LCA) se obtienen a partir del CA y CDCA, respectivamente, a través de una reacción de deshidroxilación que tiene lugar en el intestino.

catalizadas por enzimas presentes en el citosol, en los microsomas, en las mitocondrias y en los peroxisomas de los hepatocitos. Precisamente en este último orgánulo es donde ocurre uno de los pasos finales de la cascada, la β -oxidación del ácido $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi- 5β -colestanoico y del ácido $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroxi- 5β -colestanoico para dar lugar respectivamente al CDCA y CA (Clayton, 2011). Pero además de esta ruta de síntesis clásica, existe otra ruta alternativa en la que se produce una oxidación de la cadena lateral del colesterol previa a las modificaciones del núcleo esteroídico. Esto supone la producción de metabolitos intermedios con carácter ácido, por lo que esta ruta alternativa es también conocida como “ruta ácida”. El producto final de este proceso es el CDCA y, aunque la contribución de esta ruta a la síntesis total de ácidos biliares depende de cada especie, en humanos tan solo supone un 10% en condiciones normales, si bien puede incrementarse en individuos con enfermedades hepáticas (Monte y col., 2009). El paso final en este proceso de síntesis es la conjugación del CA y CDCA, con taurina o glicocola, a través de un enlace amida entre el carboxilo terminal de la cadena lateral y el grupo amino de estos aminoácidos. Dicha reacción de conjugación ocurre en los peroxisomas y es catalizada por una N-aciltransferasa denominada BAAT (*Bile Acid; CoA: amino acid N-acyltransferase*) (Russell, 2003).

Los ácidos y las sales biliares son liberados desde el hígado a la bilis y, a través de los canalículos biliares, son dirigidos hacia la vesícula biliar. En esta se dan las condiciones adecuadas que permiten su agregación para dar lugar a micelas mixtas, las cuales se encargan de transportar fosfolípidos y colesterol desde el hígado al intestino. Con la ingesta de alimentos se estimula la liberación gradual de bilis desde la vesícula, de modo que estas micelas mixtas alcanzan el duodeno y sufren una serie de cambios en su composición. Esencialmente, sus fosfolípidos son hidrolizados y absorbidos por el epitelio intestinal, de modo que las micelas quedan enriquecidas en colesterol. Es entonces cuando las micelas interaccionan con las vesículas lipídicas procedentes del estómago llevando a cabo su principal papel fisiológico como emulsionante de las grasas de la dieta y favoreciendo su degradación a través de las enzimas digestivas. De este modo funcionan como un mecanismo de transporte para monoglicéridos y triglicéridos, los cuales, al alcanzar las microvellosidades intestinales, difunden directamente debido a su gran afinidad por la membrana plasmática de las células epiteliales (Phan y Tso, 2001).

A lo largo de su tránsito por el tracto intestinal, una pequeña cantidad de ácidos biliares es reabsorbida en los primeros tramos del intestino delgado por difusión pasiva,

aunque la gran mayoría (~95%) lo hace en el íleo a través de transportadores apicales dependientes de sodio (ASBT, *Apical sodium-dependent bile acid transporter*). Este transportador facilita el simporte de dos iones sodio junto con una molécula de ácido biliar al interior del enterocito (St-Pierre y col., 2001). Una vez internalizados, estos ácidos biliares difunden a lo largo del enterocito hacia la membrana basolateral, donde un heterodímero α/β transportador de solutos orgánicos (OST α /OST β , *Organic Solute Transporter*) los expulsa hacia la circulación sanguínea portal. Una vez conducidos hacia los sinusoides hepáticos son internalizados en los hepatocitos mayoritariamente a través de un péptido cotransportador de taurocolato dependiente de sodio (NTCP, *Na⁺-dependent taurocholate cotransport peptide*) (Hofmann y Hagey, 2008). De este modo, las sales biliares retornan al hígado, donde vuelven a ser secretadas a la bilis. Este proceso es conocido como circulación enterohepática y permite que una misma molécula de ácido biliar sea utilizada repetidamente, minimizándose el gasto energético que supondría su biosíntesis continua. Así, un conjunto de unos 3 gramos de ácidos biliares se recicla de 4 a 12 veces al día, mientras que la pérdida a través de las heces (0,2-0,6 gramos/día) se repone por síntesis *de novo* en el hígado con el fin de mantener una reserva constante de ácidos biliares en el organismo (Chiang, 2009).

Los ácidos biliares sufren modificaciones adicionales debido a la acción de las bacterias intestinales, esencialmente por desconjugación y oxidación de grupos hidroxilo. Aunque la reabsorción de ácidos biliares en el íleo es bastante eficaz, parte de estas moléculas (<1g/día) alcanza el intestino grueso. Las principales modificaciones que ocurren en el colon humano incluyen la 7 α -deshidroxilación, desconjugación y oxidación/epimerización de los grupos hidroxilo de los carbonos C₃, C₇ y C₁₂. De todas ellas, la deshidroxilación en C₇ es cuantitativamente la más importante, y la realizan deshidratasas de la flora anaerobia intestinal. Esta biotransformación da lugar a los ácidos biliares secundarios desoxicólico (DCA, *deoxycholic acid*) y litocólico (LCA, *lithocholic acid*) a partir del CA y CDCA respectivamente (Figura 2). Por otro lado, la epimerización del CDCA da origen al ácido ursodesoxicólico (UDCA, *ursodeoxycholic acid*). La desconjugación y 7 α -deshidroxilación de los ácidos biliares incrementa ligeramente su pKa e hidrofobicidad, permitiendo un pequeño grado de recuperación por absorción pasiva a través del epitelio colónico. Esto permite el reciclado del DCA junto al CA y CDCA en el hígado, mientras que el LCA (altamente hidrofóbico) suele ser sulfatado en los hepatocitos con el fin de disminuir su toxicidad al incrementar su solubilidad en agua (Monte y col., 2009).

Cabe señalar que las concentraciones de ácidos biliares, tanto en la bilis propiamente dicha como en el tracto digestivo, dependen de varios factores como la edad, la dieta o la existencia de diferentes situaciones patológicas. En este sentido, la edad se comporta como un factor determinante. Así, en recién nacidos sólo se detectan ácidos biliares primarios ya que la flora bacteriana anaerobia del colon no se desarrolla hasta el primer año de vida. A partir de ese momento la concentración de DCA continúa aumentando a lo largo de toda la vida del individuo, pudiendo llegar a ser el ácido biliar más abundante en adultos. Aún existe cierta controversia en cuanto a las concentraciones estimadas de ácidos biliares en el tracto intestinal. En condiciones fisiológicas la concentración de ácidos biliares en el colon es baja en comparación con la presente en la vesícula biliar (~300 mM) o el intestino delgado (~10 mM), pero valores tan altos como 1 mM pueden alcanzarse en aguas fecales en condiciones patológicas o debido a una dieta rica en grasas (Stadler y col., 1988; de Kok y col., 1999; Hofmann, 1999).

Finalmente se debe destacar que, además de su principal papel fisiológico como agentes emulsionantes de la dieta, los ácidos biliares ejercen otras funciones biológicas importantes en el organismo. En primer lugar, y como es lógico, son fundamentales en la regulación de los niveles de colesterol, dado que éstos dependen del balance que existe entre biosíntesis *de novo* de ácidos biliares, absorción del colesterol intestinal y excreción por las heces de sus derivados (Javitt, 2002). También son capaces de facilitar la digestión por otras vías, ya que modulan la secreción y actividad de diversas enzimas pancreáticas (Koop y col., 1996), así como la absorción de calcio (Saso y col., 2001). Por otra parte, los ácidos biliares también se comportan como potentes agentes antimicrobianos y, por tanto, como reguladores de la flora bacteriana del tracto digestivo. Se ha comprobado que son capaces de provocar daños en las membranas y en el DNA bacteriano, además de generar estrés oxidativo, desnaturalización y plegamientos erróneos de proteínas, disminución de los niveles de calcio y hierro a través de su actividad quelante, e incluso formación de estructuras secundarias en el RNA (Begley y col., 2005). Pero dos de las funciones fundamentales que ejercen los ácidos biliares en relación al mantenimiento de la homeostasis del epitelio colónico, y que se expondrán a continuación con mayor profundidad, son tanto su capacidad moduladora de la señalización celular, como su papel regulador de procesos apoptóticos. Ambas funciones se encuentran estrechamente relacionadas con diferentes situaciones patológicas y, principalmente, con la generación de cáncer colorrectal.

1.2.2. Ácidos biliares y señalización celular en células de colon

A lo largo de los últimos años se ha evidenciado la capacidad de los ácidos biliares para activar diferentes rutas de señalización celular. Aunque estos procesos de señalización se han caracterizado de forma más profunda en hepatocitos, los ácidos biliares actúan en las células de colon de manera muy similar a la que lo hacen en otras células enterohepáticas, aunque a través de diferentes mecanismos y respuestas (Hylemon y col., 2009). Así, en las células HCT-116 y Caco-2 se ha comprobado que los ácidos biliares son capaces de inducir alteraciones en la membrana plasmática provocando cambios en sus propiedades fisicoquímicas e incluso en su composición lipídica (Akare y Martinez, 2005; Jean-Louis y col., 2006; Hylemon y col., 2009). Estos efectos parecen estar estrechamente relacionados con su naturaleza hidrofóbica ya que pueden mimetizarse mediante el empleo de otras moléculas hidrofóbicas no relacionadas con los ácidos biliares. Además el DCA y otros ácidos biliares inducen un incremento en los niveles de colesterol en la membrana plasmática, acompañados por una disminución en su fluidez. Se ha propuesto que este mecanismo podría constituir una respuesta celular cuya finalidad es incrementar la rigidez de la membrana, previniendo así la lisis debida al efecto detergente de los ácidos biliares (Jean-Louis y col., 2006).

Una de las principales consecuencias de estas perturbaciones en la membrana parece ser la activación de diferentes rutas de señalización, entre ellas las de la PKC (*Protein Kinase C*) y el EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Se ha propuesto que la activación de la PKC α dependiente de ácidos biliares es consecuencia de una curvatura en la membrana, así como de cambios en la estructura y composición lipídica, puesto que la actividad de la PKC está fuertemente influenciada por las propiedades fisicoquímicas de la membrana (Akare y Martinez, 2005). También se ha comprobado que el DCA es capaz de promover la translocación y alterar la localización subcelular de las isoformas PKC- β 1, - δ , y - ϵ en las células HCT-116, y que los cambios en la actividad de estas isoformas puede tener un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la morfogénesis del epitelio colónico (Looby y col., 2005). Por otra parte, se ha demostrado la activación de la PKC y la PLC por DCA a través de la liberación de Ca^{2+} desde orgánulos de almacenamiento hacia el citoplasma (Lau y col., 2005). A pesar de que no se conocen los mecanismos moleculares responsables de esta

liberación de Ca^{2+} , se postula que podrían estar relacionados con un estrés de retículo endoplásmico observado en diferentes líneas celulares de cáncer de colon debido al tratamiento con ácidos biliares.

Los ácidos biliares activan la ruta del EGFR de forma independiente de ligando, proceso de activación similar al observado para la PKC, donde los cambios en la composición y estructura de la membrana plasmática son esenciales. De hecho, esta familia de receptores generalmente se ubica en microdominios de la membrana denominados “balsas lipídicas” (*lipid rafts*), caracterizados por ser ricos en esfingomielina, colesterol y diversos tipos de receptores. El DCA es capaz de alterar tanto la posición como la cantidad de *lipid rafts* en las células HCT-116, lo que activa rutas de señalización intracelular (Jean-Louis y col., 2006). Es más, se ha observado que diferentes conjugados del DCA estimulan la señalización y la proliferación en las células de cáncer de colon H508 que coexpresan EGFR y el receptor muscarínico M3R, pero no en células CHO y SNU-C4 que sólo expresan M3R o EGFR, respectivamente (Cheng y Raufman, 2005). Se ha propuesto, que en muchos tipos de células, las señales mitogénicas producidas por receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein-coupled receptor*) como M3R, requieren la transactivación de EGFR. En este sentido hay que señalar la existencia de unos GPCR de superficie celular denominados TGR5 (Kawamata y col., 2003). Estos receptores responden a ácidos biliares y parecen ser esenciales para la activación de EGFR inducida por estos agentes en células gástricas, así como para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) por estimulación de la NAD(P)H oxidasa NOX5-S en células esofágicas (Yasuda y col., 2007; Hong y col., 2010), si bien no se ha detectado la expresión de estos receptores TGR5 en células de colon.

Una de las rutas de señalización más relevantes de entre todas las que se ven afectadas por el tratamiento con ácidos biliares en células de colon es la de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Esta familia de quinasas es capaz de transmitir la mayor parte de las señales extracelulares desde la membrana al núcleo y está compuesta principalmente por tres miembros: la quinasa p38, la quinasa regulada por señal extracelular o ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), y la quinasa c-Jun N-terminal o JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Se ha propuesto que la estimulación de estas MAPK inducida por ácidos biliares en células de colon humano, es el resultado de la activación previa de otras cascadas de señalización. Por ejemplo, en las células HCT-116 y Caco-2 la estimulación de ERK tras tratamiento

con ácidos biliares parece ser consecuencia de una activación previa de la PKC y depende de cambios en las propiedades fisicoquímicas de la membrana plasmática (Akare y Martinez, 2005). De igual modo, se ha observado la activación de ERK tras fosforilación de EGFR inducida por ácidos biliares en las células H508 y SNU-C4 (Cheng y Raufman, 2005). Por otro lado, se ha postulado que los ácidos biliares incrementan la producción de ROS en las células Caco-2 debido a la activación de la NADH deshidrogenasa y la xantina oxidasa, induciendo la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, *Phosphatidylinositol 3-kinase*) que, a su vez, promueve la fosforilación de p38 y ERK (Araki y col., 2005). Esta activación de p38 y ERK también se ha observado en las células HCT-116, donde parece corresponderse con una señal de supervivencia frente a los efectos proapoptóticos de los ácidos biliares (Qiao y col., 2001).

Por otro lado, también se ha descrito que el DCA es capaz de activar la ruta de señalización de la β -catenina en las células SW480 y LoVo de cáncer de colon (Pai y col., 2004). El incremento en la fosforilación de tirosinas inducido por los ácidos biliares disocia la interacción entre la β -catenina y la E-cadherina, lo que conlleva una pérdida en la adhesión, una estabilización y translocación de la β -catenina al núcleo y la estimulación de la expresión del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA, *urokinase-type plasminogen activator*), el receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR, *urokinase-type plasminogen activator receptor*), y la ciclina D1. En cuanto a otras ciclinas, el DCA parece incrementar los niveles de la ciclina E en las células HCT-116 pero no en las células Caco-2 y en colonocitos no transformados. En cambio, induce un incremento en los niveles de la ciclina A en las células Caco-2 y en células normales de colon, pero no en las células HCT-116 (Ha y Park, 2010).

Finalmente también hay que destacar los procesos de señalización nuclear activados por los ácidos biliares en células de colon por interacción directa con receptores nucleares o por regulación de diferentes factores de transcripción. Existen principalmente cuatro receptores nucleares de ácidos biliares: el receptor X farnesoide (FXR, *Farnesoid X Receptor*), el receptor X pregnano (PXR, *Pregnane X Receptor*), el receptor X de hígado (LXR *Liver X Receptor*) y el receptor de vitamina D (VDR, *Vitamin D Receptor*). Aunque el papel principal de estos receptores de ácidos biliares es el control del metabolismo de lípidos y carbohidratos, también son reguladores importantes de la proliferación, diferenciación, muerte y supervivencia celular, así como de la invasión y metástasis. La expresión de FXR parece estar disminuida en líneas

celulares derivadas de adenocarcinoma de colon, lo que se correlaciona inversamente con el grado de diferenciación. Así, las células SW480 y SW620, con una capacidad tumorigénica y metastásica elevada, no expresan el receptor FXR, mientras que los niveles son significativos en células menos tumorigénicas, como las Caco-2 y HT-29 (De Gottardi y col., 2004). En dos modelos experimentales con ratones para cáncer intestinal, la deficiencia en FXR produce un incremento significativo tanto en el número de tumores como en su tamaño (Maran y col., 2009), localizándose lesiones de tipo adenomatoso y numerosas criptas aberrantes en ratones FXR^{-/-} APC^{-/-} (Modica y col., 2008). Por otra parte, se ha observado que PXR ejerce un efecto protector en las células HCT-116 frente a los efectos apoptóticos del DCA debido a la expresión alterada de numerosos genes relacionados con la apoptosis, como *Mcl-1* (*Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*), *BAK1* o *TP53* (Zhou y col., 2008). La expresión de VDR incrementa en cánceres colorrectales, hecho que se asocia con mutaciones en los genes *PIK3CA* y *KRAS*, independientemente de las características clínicas, patológicas y moleculares, si bien no se ha observado ninguna relación con la supervivencia de los pacientes (Kure y col., 2009).

1.2.3. Estrés oxidativo

Uno de los efectos citotóxicos importantes que ejercen los ácidos biliares es el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y la consiguiente inducción de la apoptosis por estrés oxidativo. Una de las principales fuentes de producción de ROS en células de colon por tratamiento con ácidos biliares, es la activación de diferentes enzimas presentes en la membrana plasmática, como las NAD(P)H oxidasas, la PLA₂ o la PLC. Estas enzimas pueden activarse por alteraciones en la estructura y composición de la membrana plasmática, efecto estrechamente relacionado con la hidrofobicidad y el efecto detergente de los ácidos biliares (Akare y Martinez, 2005; Jean-Louis y col., 2006).

La activación de receptores, como EGFR o incluso Fas, dispara una cascada de señalización que, en último término, puede provocar un incremento en la producción de ROS a través de diferentes rutas. Así, en las células HT-29, la activación de la PLC por DCA promueve la salida de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico (Marchetti y col., 1997). En hepatocitos los niveles elevados de Ca²⁺ intracelular pueden inducir la expresión de la óxido nítrico sintasa-3 (NOS-3) con el consiguiente incremento en la

producción de NO (Gonzalez-Rubio y col., 2010). En cuanto a la PLA₂, se ha propuesto que los ácidos biliares pueden incrementar su actividad en las células Caco-2 por alteraciones en la permeabilidad transepitelial (Araki y col., 2005). Esto supone, a su vez, un aumento en la producción de ácido araquidónico por la PLA₂, lo que se ha relacionado con un incremento en los niveles de ROS a través de las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas como un subproducto de la síntesis de prostaglandinas. En cuanto a las NAD(P)H oxidasas, en hepatocitos se ha observado que la activación de estas enzimas, y la consiguiente producción de ROS, es esencial para la apoptosis inducida por ácidos biliares (Reinehr y col., 2005), si bien estos mecanismos no se han estudiado con profundidad en células de colon.

Los ácidos biliares pueden disparar cascadas de señalización por activación independiente de ligando de receptores presentes en la membrana plasmática, como Fas. Así, se ha propuesto un mecanismo en las células HCT-116 y HT-29 a través del cual los ácidos biliares inducen apoptosis por activación de Fas (Katona y col., 2009). Dicha activación parece estar relacionada con un incremento en la generación de ROS que provoca la rotura proteolítica de la procaspasa-8. Aunque esta caspasa iniciadora se relaciona generalmente con la ruta extrínseca de apoptosis, la ruptura proteolítica de Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) para dar lugar al fragmento tBid, puede disparar, a su vez, la ruta intrínseca mitocondrial con la ulterior producción de ROS por un anormal funcionamiento de los complejos de transporte electrónico de la mitocondria. Este daño mitocondrial a través de la caspasa-8 y tBid no está claro en células de colon, ya que mientras que se ha detectado activación de Bid por DCA y LCA en las células HT-29 y HCT-116 (Katona y col., 2009), también ha podido observarse apoptosis inducida por DCA en las células HCT-116 de manera independiente a esta proteína proapoptótica (Yui y col., 2005).

Por otro lado el incremento en la producción de ROS también ocurre debido a perturbaciones en la mitocondria inducidas por los ácidos biliares. En primer lugar, y en relación con el papel de proteínas proapoptóticas en el daño mitocondrial inducido por ácidos biliares, existen diferentes miembros de la familia Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) que son capaces de alterar la estructura de la membrana mitocondrial, provocando así un mal funcionamiento en la cadena de transporte electrónico con la consiguiente pérdida de potencial mitocondrial. Por otro lado, el estrés inducido por ácidos biliares sobre el retículo endoplásmico puede estar a su vez asociado con estrés mitocondrial. El daño inducido por los ácidos biliares favorece la liberación de Bak (miembro proapoptótico

de la familia de Bcl-2) del retículo con su consiguiente unión a la membrana mitocondrial. En este sentido se ha observado en las células HEK-293T de riñón que, tras estrés de retículo endoplásmico, las moléculas Bim y PUMA (con un único dominio BH3) son capaces de inducir la liberación de citocromo c de la mitocondria y la ulterior apoptosis con la presencia única de Bak reticular (Klee y col., 2009). Además, se ha descrito que alteraciones en la fluidez de la membrana mitocondrial por ácidos biliares hidrofóbicos pueden provocar un mal funcionamiento de la cadena de transporte electrónico (Palmeira y Rolo, 2004). En esta misma dirección, el ácido araquidónico promueve la generación de ROS por interacción con la cadena mitocondrial de transporte electrónico (Cocco y col., 1999) y, como se ha señalado anteriormente, los ácidos biliares pueden incrementar los niveles intracelulares de ácido araquidónico por estimulación de la actividad PLA₂.

Finalmente, cabe mencionar la relación entre la inducción de ROS por ácidos biliares y el factor de transcripción NF-κB, que es esencial en varios procesos celulares como inflamación, inmunidad, proliferación celular y apoptosis. NF-κB puede ser activado a través de rutas dependientes e independientes de ROS (Gloire y col., 2006; Morgan y Liu, 2011). Así, en las células HCT-116 y HT-29, el DCA es capaz de inducir la expresión de NF-κB a través de diferentes mecanismos en los que estarían implicadas la NAD(P)H oxidasa, la Na⁺/K⁺-ATPasa, el citocromo P450, Ca²⁺ y el complejo respiratorio mitocondrial IV (Glinghammar y col., 2002; Payne y col., 2007). Cabe destacar que en las células resistentes a DCA obtenidas a partir de la línea HCT-116 se ha observado una activación constitutiva de NF-κB, hecho responsable, al menos en parte, de su resistencia a la apoptosis (Crowley-Weber y col., 2002). En este mismo sentido, se ha postulado que la resistencia inducida por ácidos biliares a diferentes estímulos apoptóticos en células de cáncer de colon podría estar relacionada con una activación de NF-κB dependiente de Akt en las células A508 y HT-29 (Shant y col., 2009).

1.2.4. El daño en el DNA y la proteína p53

Varios estudios han demostrado la capacidad de los ácidos biliares para inducir daño en el DNA en diferentes líneas celulares de colon, como las células HCT-116, HT-29, Caco-2 y FHC (Marchetti y col., 1997; Haza y col., 2000; Powolny y col., 2001; Rosignoli y col., 2008). Este efecto genotóxico se ha relacionado con un incremento en

la producción de ROS tras el tratamiento con ácidos biliares (principalmente DCA y LCA), habiéndose comprobado el efecto protector de varios antioxidantes presentes en la dieta, como los β -carotenos o el α -tocoferol (Rosignoli y col., 2008). Dado que *TP53* es un gen supresor de tumores relacionado con la respuesta apoptótica a diferentes tipos de estrés celular (principalmente daño en el DNA), podría sospecharse que la apoptosis inducida por ácidos biliares fuera dependiente de la proteína p53. Aunque diferentes autores han intentado dilucidar el papel de este factor de transcripción en la inducción de apoptosis por ácidos biliares en células del colon, los datos obtenidos en diferentes líneas de cáncer de colon sugieren que el DCA es capaz de promover la apoptosis de forma independiente de p53. Se ha observado que el DCA induce daño en el DNA y apoptosis en células epiteliales de colon humano que expresan tanto p53 mutante (HCT-15, Caco-2 y HT-29) como silvestre (HCT-116) (Powolny y col., 2001). También se ha descrito en células HCT-116 que el DCA es capaz de estimular la degradación de p53 a través del proteasoma (Qiao y col., 2001). Este hecho a su vez podría incrementar la mutagénesis inducida por ácidos biliares provocando un aumento en el riesgo de la formación de tumores. Por último cabe destacar la importancia de *GADD153* (*growth arrest- and DNA damage- inducible gene 153*) en la apoptosis inducida por ácidos biliares. Este gen codifica un factor de transcripción de la familia C/EBP (*CCAAT-enhancer-binding protein*) que se expresa en niveles casi indetectables en células humanas normales, pero cuya expresión se incrementa drásticamente tras daño genotóxico y otros tipos de estrés. Aunque su mecanismo de actuación aún no se conoce en profundidad, se sabe que está implicado en el control del ciclo celular, apoptosis y tumorigénesis. Se ha comprobado que el DCA incrementa significativamente la expresión de *GADD153* en las células HCT-116, siendo este gen esencial para la apoptosis inducida por ácidos biliares (Qiao y col., 2002). Este mecanismo apoptótico dependiente de *GADD153* e independiente de p53 ya ha sido previamente observado en las células Hela (Zheng y col., 1996).

1.2.5. Ácidos biliares como agentes carcinogénicos en colon

Independientemente de diferentes situaciones patológicas, tanto adquiridas como heredadas genéticamente, los niveles de ácidos biliares pueden elevarse anormalmente en la ingesta de una dieta rica en grasas saturadas. Dado que una concentración alta de ácidos biliares puede promover daños en el DNA, con las consiguientes mutaciones en

oncogenes y genes supresores de tumores, su capacidad como agentes carcinogénicos en el tracto intestinal es evidente. Si a este hecho se le añade la alta tasa de renovación celular del epitelio colónico, así como la posibilidad de aparición de células transformadas con resistencia frente a los efectos apoptóticos de los ácidos biliares y otros componentes del lumen intestinal (como el butirato), se puede llegar a una situación favorable a la aparición de procesos carcinogénicos. Además, la exposición continua de esta población de células resistentes a concentraciones altas de ácidos biliares, promueve la adquisición de modificaciones genéticas adicionales debido a los efectos genotóxicos de estos agentes carcinogénicos, lo que puede incrementar tanto la capacidad proliferativa, como la agresividad y capacidad invasiva de estas células cancerosas.

En este sentido, numerosos estudios *in vitro* con diferentes líneas celulares de cáncer de colon apoyan esta hipótesis. Se ha observado que concentraciones bajas de DCA estimulan el crecimiento de las células HT-29 y Caco-2, mientras que concentraciones altas inducen apoptosis, lo que apunta a un mecanismo promotor de cáncer a través de un incremento en la renovación de las células epiteliales del colon (Milovic y col., 2002). Este efecto proliferativo del DCA también se ha observado en las células de cáncer de colon humano A508, mediado por una transactivación de EGFR (Cheng y Raufman, 2005). Es más, en las células SW480 y LoVo, el DCA no sólo es capaz de promover el crecimiento celular, sino también la invasividad por activación de la ruta de señalización de la β -catenina (Pai y col., 2004). Teniendo en cuenta este efecto proliferativo de los ácidos biliares en las células de cáncer de colon, la adquisición de resistencia a apoptosis inducida por altas concentraciones de estos agentes parece constituir uno de los principales riesgos en la aparición de tumores colónicos.

Cabe mencionar que se han desarrollado células resistentes a la apoptosis inducida por DCA (células HOMUR) derivadas de la línea celular de cáncer de colon HCT-116 que no sólo exhiben un fenotipo más agresivo respecto a las parentales, sino también resistencia a otros agentes anticancerígenos, como el etopósido, el cisplatino o la adriamicina (Powell y col., 2006). Es más, el subcultivo de forma seriada de células HCT-116 en presencia de concentraciones crecientes de DCA permitió obtener células resistentes a los efectos apoptóticos de este ácido biliar y capaces de crecer en presencia de concentraciones de DCA de hasta 0,5 mM, sufriendo un incremento en la expresión de varios genes implicados en apoptosis y etapas tempranas de la carcinogénesis, como

NFKB, *BCL2* o *HSPA5* entre otros (Crowley-Weber y col., 2002). Un estudio proteómico llevado a cabo en estas líneas celulares resistentes a DCA puso de manifiesto un perfil de expresión proteica alterado, con disminución de la expresión de proteínas proapoptóticas, sobreexpresión de las antiapoptóticas, y reducida expresión de proteínas relacionadas con funciones de reparación del DNA y control del ciclo celular, las cuales pueden dar lugar a inestabilidad cromosómica acelerando el proceso de aparición del cáncer (Bernstein y col., 2004). Finalmente, nuestro grupo de investigación también ha desarrollado una línea celular de cáncer de colon resistente parcialmente a la apoptosis inducida por ácidos biliares (Perez-Ramos y col., 2005). Aunque la característica principal de estas células BCS-TC2.BR2 es su resistencia a los efectos diferenciadores y apoptóticos del butirato (Lopez de Silanes y col., 2004), hemos comprobado que dicha resistencia es extensible a diferentes tipos de estrés, como estrés térmico o estrés hiperosmótico entre otros (Olmo y col., 2007).

1.3. APOPTOSIS

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico esencial en la homeostasis de todos los organismos, y que se induce a través de diferentes estímulos. A diferencia de la necrosis, que es un tipo de muerte celular pasiva y desregulada, la muerte celular programada es un proceso activo gobernado por diferentes rutas de señalización, cascadas de activación de proteínas y modulación de la expresión génica. Las células apoptóticas muestran ciertas características típicas de la activación del programa apoptótico, como la condensación del DNA y la degradación internucleosomal, pérdida en la asimetría de membrana y la formación de cuerpos apoptóticos (Chowdhury y col., 2006). Este proceso facilita que los restos celulares puedan ser digeridos por las células circundantes o por los macrófagos. Existen diferentes rutas moleculares a través de las cuales la célula puede activar estos procesos de muerte celular programada (Schultz y Harrington, 2003). Las dos mejor caracterizadas hasta el momento son la ruta intrínseca, que conlleva perturbaciones en la mitocondria, y la ruta extrínseca, que requiere la activación de receptores de membrana a través de diferentes estímulos extracelulares. Un mecanismo alternativo de apoptosis ocurre por estrés del retículo endoplásmico y se caracteriza por errores en el procesamiento y transporte de proteínas, así como en una pérdida de la homeostasis del calcio intracelular. Independientemente de los diferentes mecanismos y características

de cada una de estas rutas, todas ellas convergen finalmente en la activación de diferentes miembros de la familia de las caspasas. Estas proteasas degradan diferentes dianas nucleares y citoplasmáticas, constituyendo los auténticos ejecutores del programa apoptótico. Los mecanismos de inducción de apoptosis por ácidos biliares se resumen en la Figura 3.

1.3.1. Ruta extrínseca o mediada por receptor

Los receptores de muerte se localizan en la superficie celular y disparan señales proapoptóticas tras el reconocimiento y unión de sus ligandos de muerte correspondientes. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral/factor de crecimiento nervioso (TNF/NGF, *tumor necrosis factor/nerve growth factor*), y todos ellos son proteínas transmembrana de tipo I con un extremo C-terminal intracelular, una región intermembrana, y un dominio N-terminal extracelular responsable de la interacción con el ligando. Todos ellos presentan homología en una región presente en el dominio extracelular que contiene de una a cinco repeticiones ricas en cisteína, así como una secuencia citoplasmática muy conservada denominada dominio de muerte (DD, *Death Domain*). Los receptores de muerte mejor caracterizados hasta la fecha son el receptor-1 de TNF (TNFR1), CD95 (Fas o Apo1) y los receptores-1 y -2 de TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) denominados DR4 y DR5, respectivamente (Bhardwaj y Aggarwal, 2003).

Los eventos de señalización se inician con la unión del ligando correspondiente al receptor, lo que induce cambios conformacionales que promueven la oligomerización de los receptores y el ensamblaje de un complejo proteico conocido como complejo de señal inductora de muerte (DISC, *Death-inducing signaling complex*). Estos complejos agrupan a diferentes moléculas adaptadoras sin actividad enzimática pero capaces de asociarse a los receptores a través de interacciones homofílicas con el dominio de muerte del receptor. Estas proteínas adaptadoras contienen los denominados dominios efectores de muerte (DED, *death effector domains*) que son los responsables de mediar el reclutamiento de las caspasas-8 y -10 al DISC, lo que conlleva su autoproteólisis y su consiguiente activación (Mahmood y Shukla, 2010). En este sentido, la caspasa-8 se identifica como la principal caspasa iniciadora activada por receptor y, en función del tipo celular, puede iniciar diferentes cascadas de muerte. Así, se conocen como células de tipo I aquellas en las que la activación de la caspasa-8 es suficiente

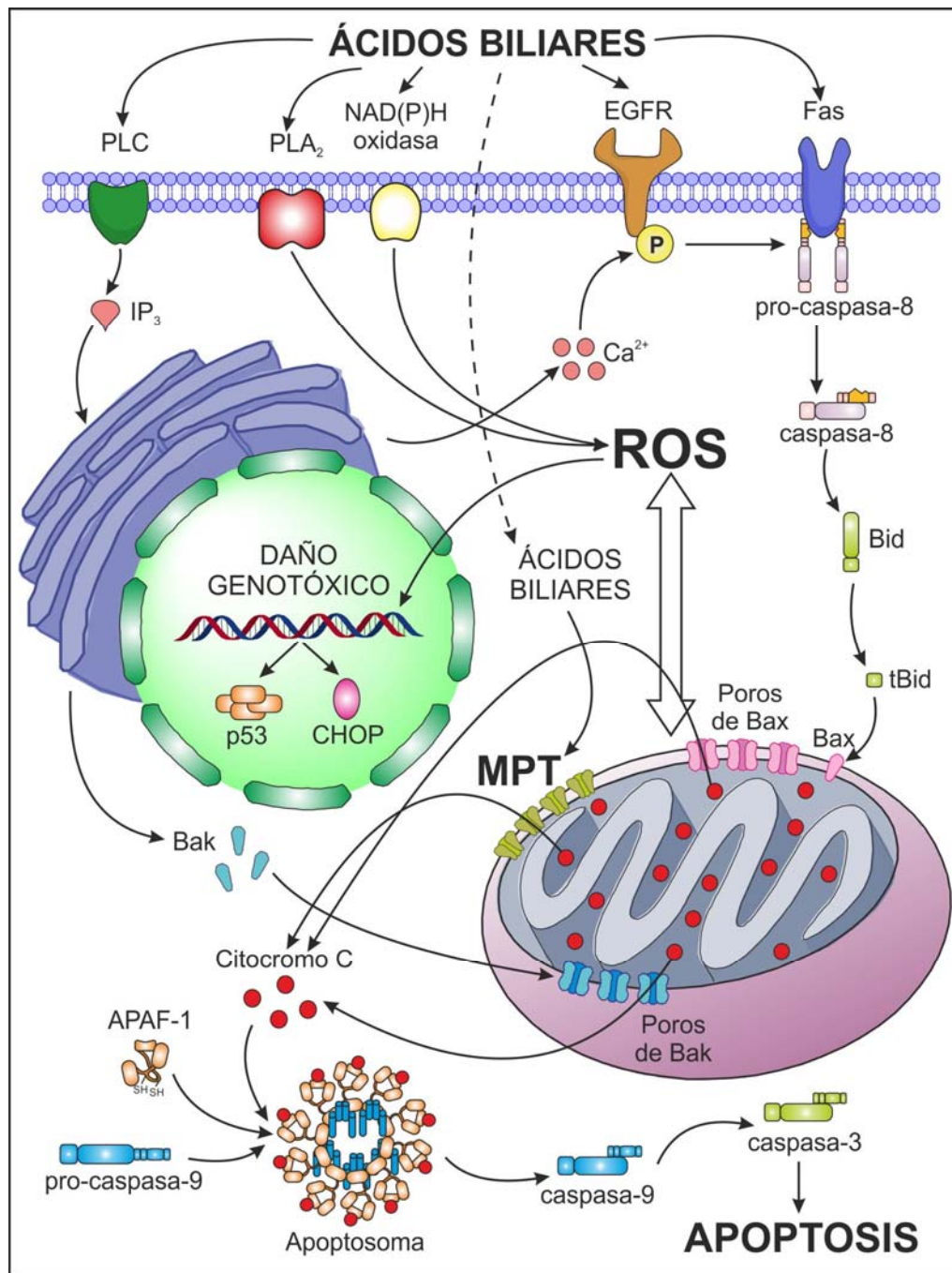


Figura 3. Apoptosis inducida por ácidos biliares.

Los ácidos biliares pueden alterar la actividad de enzimas presentes en la membrana plasmática, como las NAD(P)H oxidasas o la PLA₂. Ambas generan, directa o indirectamente, un incremento en las especies reactivas de oxígeno promoviendo estrés oxidativo. Por otro lado la activación de la enzima PLC puede promover la ruta apoptótica de retículo endoplásmico (con liberación de Bak y salida de Ca²⁺), mientras que la acción de los ácidos biliares sobre receptores de membrana como EGFR o Fas, es capaz de inducir la ruta extrínseca de apoptosis, con la consiguiente activación de caspasa-8. El estrés oxidativo promueve la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) y la salida de factores proapoptóticos al citoplasma, como el citocromo c. Tras el ensamblaje del apoptosoma, la activación de las caspasas-9 y -3 ejecutan el programa apoptótico. La degradación de Bcl-2, y la consiguiente liberación de Bax, promueven la formación de poros adicionales en la mitocondria. Por otro lado, el estrés oxidativo genera daño genotóxico con la correspondiente activación de factores como p53 y CHOP, que promueven parada de ciclo celular y, en último término, apoptosis.

para iniciar el programa apoptótico por procesamiento y activación directa de caspasas efectoras, como las caspasas-3 y -7. Sin embargo, en las células denominadas de tipo II, como los hepatocitos, la activación de la caspasa-8 no es suficiente para iniciar el programa apoptótico y es necesaria una señal amplificadora adicional a través de perturbaciones en la mitocondria (Barnhart, 2003). En este caso, la caspasa-8 activa a Bid generando la forma truncada activa conocida como tBid (o p15). Sólo entonces tBid es capaz de inducir cambios conformacionales en Bax (*Bcl-2-associated X protein*) y Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) promoviendo su oligomerización y la consiguiente permeabilización mitocondrial y liberación de factores proapoptóticos al citosol, como el citocromo c, activándose a su vez la ruta intrínseca o mitocondrial (Kantari y Walczak, 2011).

1.3.2. Ruta intrínseca o mitocondrial

En la ruta mitocondrial están involucrados esencialmente dos protagonistas con un papel fundamental en la inducción del programa apoptótico: la mitocondria, y los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Parone y col., 2002). La ruta intrínseca se dispara a través de distintos tipos de estrés intracelular que, en último término, provocan perturbaciones en la mitocondria con su consiguiente permeabilización, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación de factores proapoptóticos al citoplasma. La pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial puede ocurrir a través de dos mecanismos diferentes. En el primero de ellos, diversos tipos de estímulos o de estrés intracelular promueven la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT, *Mitochondrial Permeability Transition*). El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP, *Permeability Transition Pore*) consiste en un complejo multiproteico que contiene un canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC, *Voltage-dependent anion channel*) en la membrana externa, el transportador de nucleósidos de adenina (ANT, *Adenine nucleoside translocator*) en la membrana interna, la proteína de matriz ciclofilina D, la creatina quinasa en el espacio intermembrana, y la hexoquinasa citosólica. El incremento en la permeabilidad tras la inducción del MPT permite la liberación de diferentes factores proapoptóticos de la mitocondria, como el citocromo c, que se presentan como moléculas esenciales en el inicio del programa apoptótico (Desagher y Martinou, 2000).

Los miembros de la familia Bcl-2 también desarrollan un papel protagonista en la ruta intrínseca de apoptosis. Esta familia de proteínas incluye tanto miembros proapoptóticos como antiapoptóticos, pero todos ellos caracterizados por poseer dominios de homología Bcl-2 (BH, *Bcl-2 homology*) (Chipuk y col., 2010). Los miembros antiapoptóticos de esta familia, entre ellos Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w y Mcl-1, contienen 4 dominios conservados (BH1-BH4) y una gran parte de ellos también presentan un dominio transmembrana en la región C-terminal que los dirige hacia la superficie citoplasmática de diferentes membranas intracelulares, incluyendo la membrana mitocondrial externa y el retículo endoplásmico. Los miembros proapoptóticos del grupo I, como Bax y Bak, carecen del dominio N-terminal BH4 pero contienen el resto de dominios BH. Finalmente, los miembros proapoptóticos del grupo II, Bid, Bad, Bim, Noxa y PUMA entre otros, sólo comparten homología de secuencia en sus dominios BH3. Por esta razón los miembros de este grupo también son conocidos como “proteínas con un único dominio BH3” (BOP, *BH3-only proteins*), para distinguirlos de aquellos con múltiples dominios BH y que se encuentran circunscritos a otros grupos. Este sistema funciona como un reostato, de modo que la sensibilidad de la célula a un estímulo de muerte depende de la capacidad de interacción entre proteínas pro y antiapoptóticas para formar homo o heterodímeros. Diferentes estímulos proapoptóticos pueden conducir a cambios conformacionales en los miembros proapoptóticos multidominio Bax y Bak, induciendo su oligomerización e inserción en la membrana mitocondrial para formar poros (Degli Esposti y Dive, 2003). Por otro lado, los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 previenen dicha oligomerización por interacción directa con Bax y Bak, mientras que los miembros proapoptóticos con un único dominio BH3 desplazan esta interacción por heterodimerización con los miembros antiapoptóticos. Esto conduce a la liberación de Bax y Bak de modo que les permite formar poros e incrementar la permeabilidad mitocondrial. Además, algunas proteínas con un único dominio BH3, como Bid, pueden interaccionar directamente con Bax y Bak facilitando su inserción en la membrana mitocondrial externa.

Independientemente del mecanismo implicado en el incremento de la permeabilidad mitocondrial (MPT u oligomerización de Bax/Bak), la consecuencia del estímulo apoptótico es la liberación de factores proapoptóticos desde la mitocondria al citosol. De entre todos ellos, el más importante y mejor caracterizado es el citocromo c. Una vez liberada al citosol, esta pequeña molécula forma un complejo con Apaf-1, (*Apoptotic protease-activating factor-1*) que sufre entonces un cambio conformacional

dependiente de ATP e interacciona con la caspasa-9 (Ow y col., 2008). El complejo multiproteico resultante se conoce como apoptosoma, y contiene múltiples moléculas de caspasa-9 y Apaf-1 (Riedl y Salvesen, 2007). La proximidad de estas procaspasas dentro del apoptosoma permite su autoactivación dando lugar a moléculas de caspasa-9 completamente activas. Finalmente, la caspasa-9 iniciadora activa a las caspasas efectoras, como la caspasa-3, de modo que se inicia el desensamblaje de la célula.

1.3.3. Ruta de retículo endoplásmico

Cuando la homeostasis del retículo endoplásmico se ve comprometida debido a diferentes tipos de estrés, se activa la denominada respuesta UPR (*unfolded protein response*) para intentar prolongar la supervivencia celular a través de un incremento en el plegamiento proteico, facilitando la degradación de proteínas mal plegadas, e inhibiendo la síntesis proteica. Pero las células sometidas a un estrés continuado e irreversible acaban sufriendo apoptosis. Se postula que el retículo endoplásmico puede regular la apoptosis no sólo por sí mismo, sino también por comunicación con la mitocondria (Rasheva y Domingos, 2009). De este modo, un incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico tras un estrés de retículo endoplásmico promueve la desfosforilación y translocación de Bad a la mitocondria, facilitando la activación de Bax/Bak. Por otro lado, una UPR mantenida en el tiempo puede inducir apoptosis por activación del factor de transcripción CHOP (*C/EBP homology protein*), también conocido como GADD153, que reprime la expresión transcripcional de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Szegezdi y col., 2006).

Este y otros mecanismos de regulación ejercidos por el retículo endoplásmico sobre diferentes miembros de la familia Bcl-2, pone de manifiesto la importancia de las interacciones entre mitocondria y retículo. Finalmente, en relación a la activación de caspasas, es importante mencionar el papel de la caspasa-12 en esta ruta apoptótica. La caspasa-12 se localiza en la cara citosólica del retículo endoplásmico y parece ser activada específicamente por estrés de retículo y no por la ruta mitocondrial o por la de receptores de muerte. La activación de la caspasa-12 parece ser consecuencia de una activación previa de la calpaína de forma dependiente de Ca^{2+} tras estrés del retículo. Una vez activa, la calpaína rompe la procaspasa-12 dando lugar a la caspasa-12 completamente activa, que es ahora capaz de iniciar la cascada proteolítica por activación de la caspasa-9 de forma independiente de citocromo c (Momoi, 2004).

Se conoce muy poco acerca de esta ruta apoptótica en células de colon, si bien se ha apuntado a un papel secundario del retículo endoplásmico durante la apoptosis inducida por ácidos biliares. En las células HT-29 y Caco-2 se ha observado un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} tras tratamiento con DCA y la consiguiente inducción de apoptosis (Marchetti y col., 1997; Lau y col., 2005). Aunque los mecanismos responsables de este efecto aún no se han identificado, se postula que el DCA puede activar a la PLC. La producción de inositol trifosfato (IP3) y diacil glicerol (DAG) provoca la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico que, a su vez, puede promover la activación de diferentes rutas de señalización, como la de PKC. Por otra parte, en las células HCT-116 se ha observado que el DCA es capaz de generar una dilatación del retículo endoplásmico junto a un estrés mitocondrial. Sin embargo, este estrés de retículo parece ser un efecto secundario a las alteraciones mitocondriales dado que el tratamiento con diferentes inhibidores de los complejos mitocondriales I a IV no sólo protegen frente a los efectos apoptóticos del DCA, sino también frente al estrés inducido por este ácido biliar sobre la mitocondria y el retículo endoplásmico (Payne y col., 2005).

1.4. EL BUTIRATO

1.4.1. Síntesis y fisiología

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), principalmente el acetato, el propionato y el butirato, son ácidos orgánicos producidos en el lumen intestinal por fermentación bacteriana de la fibra presente en vegetales, legumbres, frutas y cereales. La fermentación sacarolítica tiene lugar principalmente en el colon proximal, mientras que la proteolítica ocurre en el colon distal, donde los niveles de carbohidratos fermentables son mucho menores. Se estima que los SCFA pueden llegar a constituir entre el 5-15% de los requerimientos calóricos de un individuo. De entre todos ellos, probablemente el más estudiado por su importancia en la regulación de diferentes procesos biológicos es el butirato. Además de constituir la principal fuente de energía de los colonocitos, el butirato también juega un papel fundamental suprimiendo la inflamación de la mucosa intestinal, protegiendo frente al estrés oxidativo y regulando la sensación de saciedad, por lo que es considerado un elemento esencial en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio colónico (Hamer y col., 2008).

El butirato es absorbido en el intestino grueso a nivel del ciego y del colon. Este proceso lo realizan los colonocitos a través de diferentes mecanismos, siendo uno de ellos la difusión pasiva de la forma protonada a través de la membrana apical (Charney y col., 1998). Sin embargo, dado el pH del lumen colónico (\sim pH 7), el butirato (pK_a 4,7) se encuentra predominantemente en forma de anión de modo que no es capaz de atravesar la membrana mediante difusión pasiva. En este caso el transporte ocurre por difusión facilitada, y se lleva a cabo bien por intercambio con bicarbonato (HCO_3^-) (von Engelhardt y col., 1994), o a través de una familia de transportadores específicos denominados transportadores de monocarboxilatos (MCT, *monocarboxylate transporters*). La familia MCT media tanto el cotransporte electroneutro de monocarboxilatos y protones (Halestrap y Meredith, 2004), como el cotransporte electrogénico de monocarboxilatos y sodio (Srinivas y col., 2005). Por otra parte, también se ha identificado un transporte de butirato a través de intercambiadores de aniones de la familia AE (*anion exchangers*), que median el intercambio de Cl^- y bicarbonato (Yabuuchi y col., 1998). Finalmente, otro de los fenómenos de transporte asociados a este mecanismo de entrada del butirato es el intercambio apical Na^+-H^+ a través de los intercambiadores NHE (*Na^+-H^+ exchangers*) para corregir el descenso del pH intracelular provocado por el intercambio de una base fuerte (HCO_3^-) por un ácido débil (butirato $^-$). Además, los transportadores NBC (*Na^+-b icarbonate c arrier*) cotransportan Na^+ y bicarbonato al interior celular. Este Na^+ es a su vez transportado basolateralmente a través de una ATPasa Na^+-K^+ , promoviendo la absorción de agua (Vaneckova y col., 2001). Esto supone un papel adicional del butirato en la correcta recuperación de fluidos y electrolitos en el colon, regulando así el balance osmótico de la mucosa colónica.

Una vez absorbido, el butirato es metabolizado por los colonocitos a través de la β -oxidación, constituyendo su principal fuente de energía (60-80% de la energía total consumida). Se ha comprobado que deficiencias en la β -oxidación son responsables de la colitis ulcerosa y otros desórdenes intestinales, de forma que aparece un epitelio atrófico que puede desembocar en la formación de tumores (Thibault y col., 2010). Finalmente, el butirato no metabolizado es eliminado a la circulación portal por difusión pasiva o por transporte facilitado (butirato $^-/HCO_3^-$) a través de la membrana basolateral, siendo metabolizado en último término por el hígado (Bach Knudsen y col., 2003).

Los diferentes efectos reguladores ejercidos por el butirato para el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal sólo son explicables

considerando la estructura de las criptas colónicas y la exposición a distintas concentraciones de este agente. Como ya se ha mencionado en el Apartado 1.1, el programa de diferenciación celular en la mucosa intestinal se encuentra perfectamente equilibrado con la migración ascendente de las células a lo largo de las criptas (Yeung y col., 2011). En la zona basal más profunda, donde se localizan las células en división, la concentración de butirato es baja, lo que estimula la proliferación de las células epiteliales. A medida que las células migran hacia el lumen intestinal aumenta su exposición al butirato, promoviendo su diferenciación. En etapas tardías de este proceso las células epiteliales maduras alcanzan la cresta de la cripta, donde la presencia de altas concentraciones de butirato inducen un proceso de diferenciación terminal y apoptosis. De este modo, las células senescentes son eliminadas al lumen intestinal para ser posteriormente repuestas por otras células generadas en la mitad inferior de las criptas, favoreciéndose la renovación del epitelio colónico (Blottiere y col., 2003; Comalada y col., 2006). El mecanismo a través del cual el butirato es capaz de llevar a cabo estas funciones reguladoras parece estar relacionado con su actividad inhibidora de histona desacetilasas, lo que le permite alterar el patrón de expresión génica de la célula (Davie, 2003; Vanhoutvin y col., 2009).

Entre los efectos *in vitro* descritos para el butirato se encuentran la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la diferenciación y apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer de colon (Navarro y col., 1997; Hinnebusch y col., 2002). Así, numerosos estudios han puesto de manifiesto la capacidad del butirato para regular la expresión de varios genes implicados directamente tanto en el control del ciclo celular como en la inducción de apoptosis (Pajak y col., 2007). Aunque los mecanismos a través de los cuales el butirato ejerce estos efectos carcinoprotectores no se conocen con exactitud, de nuevo su capacidad para inhibir la actividad histona desacetilasa parece ser la principal responsable.

Finalmente, cabe destacar que la adquisición de resistencia a los efectos diferenciadores y apoptóticos del butirato por parte de las células del epitelio colónico puede permitir el crecimiento de una subpoblación celular con un fenotipo maligno, promovándose la aparición de tumores colorectales. Con el fin de conocer los mecanismos implicados en la adquisición de esta resistencia, se han desarrollado diferentes líneas celulares por tratamiento continuado con butirato (Lopez de Silanes y col., 2004; Fung y col., 2009; Fung y col., 2011), habiéndose también comprobado que el grado de diferenciación celular condiciona la sensibilidad frente a este agente, como

ha podido observarse en el carácter resistente de células las Caco-2 diferenciadas espontáneamente (Mariadason y col., 2001).

1.3.2. Actividad de histona desacetilasa

El DNA está compactado en el núcleo celular en forma de cromatina, siendo la unidad básica de la cromatina el nucleosoma. Este está compuesto por un núcleo proteico alrededor del cual se enrollan 147 pb del DNA, en lo que suponen casi dos vueltas a esta estructura. Su núcleo proteico está formado por un tetrámero de las histonas H3 y H4, y dos heterodímeros de las histonas H2A-H2B (Figura 4). Esta organización de la cromatina impide la accesibilidad a proteínas que deben unirse al DNA para llevar a cabo su función. Ello implica que dichas estructuras deben ser dinámicas y estar sujetas a una regulación en su estado de compactación.

Las cuatro histonas que componen el núcleo proteico del nucleosoma presentan una estructura similar que consiste en un dominio básico N-terminal que sobresale de la estructura, un dominio globular que permite las interacciones histona-histona dentro del octámero, y una cola C-terminal. Las colas de histonas no contribuyen especialmente en el mantenimiento de la estructura ni a la estabilidad del nucleosoma, pero juegan un papel esencial en el control de su empaquetamiento en estructuras superiores de enrollamiento (Peterson y Laniel, 2004). Las histonas están sujetas a un gran número de modificaciones postraduccionales que incluyen la acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación, sumoilación y ribosilación, ocurriendo la mayor parte de estas modificaciones en la cola básica N-terminal (Figura 4). La acetilación de lisinas provoca una disminución de carga de forma que se pierde parte de la interacción electrostática entre la proteína y el DNA. Esto se traduce en un estado relajado de la cromatina y, por tanto, en un ambiente permisivo para que pueda unirse toda la maquinaria proteica necesaria para procesos de transcripción o reparación (Mellor, 2006).

La acetilación de histonas es un proceso dinámico en el que actúan enzimas histona acetil transferasas (HAT; *Histone Acetyltransferases*) y enzimas histona desacetilasas (HDAC; *Histone deacetylases*) (Mellert y McMahon, 2009). Las HAT pueden agruparse en dos clases: las HAT de tipo A se localizan en el núcleo y acetilan nucleosomas en reacciones estrechamente relacionadas con la activación transcripcional, mientras que las HAT de tipo B están presentes en citoplasma y se

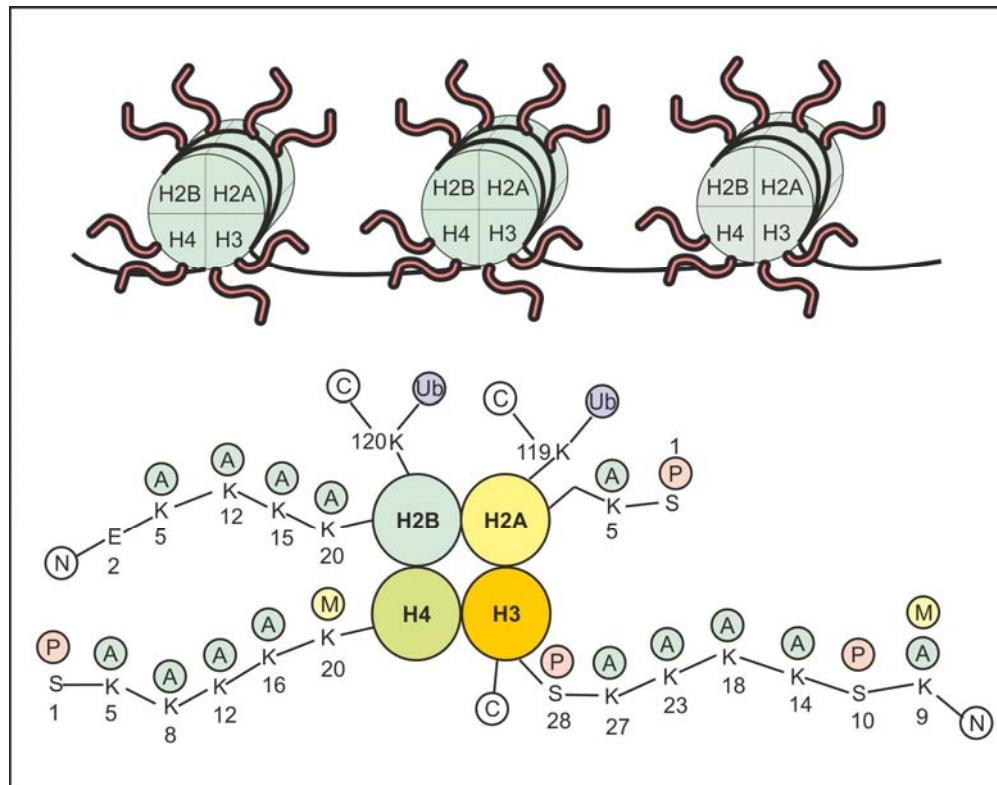


Figura 4. Mapa de modificación de histonas.

Representación esquemática del octámero de histonas, donde se indican las posibles modificaciones postraduccionales presentes en los residuos del extremo N-terminal de las histonas. A: acetilación; M: metilación; P: fosforilación; Ub: ubiquitinación.

encargan principalmente de acetilar histonas de nueva síntesis antes de ensamblarse en la cromatina durante la replicación. Así, existen numerosos reguladores transcripcionales con actividad HAT intrínseca, como PCAF, Gcn5p, SRC-1, ACTR, o p300/CBP (Marmorstein y Trievel, 2009). Pero la actividad acetiltransferasa de varias HAT no se limita a las histonas, siendo capaces de acetilar proteínas no-histonas como p53, STAT-3 y c-myc, pudiendo alterar así su función o su capacidad de unión al sustrato (Singh y col., 2010).

Por otra parte, las HDAC se relacionan con complejos represores de la transcripción. En mamíferos existen tres familias de HDAC: la clase I incluye a las HDAC1, 2, 3 y 8, mientras que la clase II engloba las HDAC4, 5, 6, 7, 9 y 10. Estas dos clases conforman la familia de HDAC clásica, mientras que la tercera clase de HDAC corresponde a la familia SIRT de desacetilasas dependientes de NAD⁺. La HDAC11 comparte características comunes a las desacetilasas de las clases I y II, por lo que no ha sido clasificada dentro de ninguna de ellas. Las HDAC de clase I se encuentran casi exclusivamente en el núcleo, pudiendo localizarse la HDCA3 en el citoplasma ya que

posee una región NES (*Nuclear Export Sequence*), mientras que las HDAC de clase II son capaces de entrar y salir del núcleo en respuesta a señales celulares (Witt y col., 2009). Las HDAC no actúan en solitario sino que forman parte de complejos proteicos. Tres de los complejos mejor caracterizados que reclutan la actividad de las HDAC1 y 2 son Sin3, NuRD y Co-REST. La HDAC3 necesita interaccionar con N-CoR y SMRT para estar completamente activa, y puede formar heterodímeros con otras HDAC como las HDAC4, 5 y 7 (de Ruijter y col., 2003). Además pueden interaccionar directamente con un gran número de proteínas de unión a DNA, como pueden ser factores de transcripción y diferentes correpresores o coactivadores. Así, el factor de transcripción YY1 (*Yin Yang 1*) regula negativamente la transcripción por unión a HDAC1, 2 y 3, pudiendo, por otro lado, ejercer un papel activador por unión a CBP/p300 (Cress y Seto, 2000). Varios receptores nucleares también se asocian directamente a las HDCA, como es el caso de los receptores de andrógenos y de estrógenos, que se acomplejan con la HDCA1 (Glozak y col., 2005).

Tanto las proteínas HAT como las HDAC se alteran en un gran número de enfermedades humanas así como en diferentes tipos de cáncer (Khan y Khan, 2010). Se ha observado que las HDAC están implicadas en la funcionalidad de productos oncogénicos generados por translocación en formas específicas de leucemia y linfoma. En este sentido la oncoproteína de fusión PML-RAR α , generada por translocación en la leucemia aguda promielocítica, reprime la transcripción asociándose a un complejo correpresor que presenta actividad HDAC (Minucci y Pelicci, 2006). Se ha comprobado también que las HDAC2 y 3 están sobreexpresadas en cáncer de colon (Zhu y col., 2004; Wilson y col., 2006), y se han detectado niveles aumentados de la HDAC1 en tumores gástricos, de esófago y de próstata (Dokmanovic y Marks, 2005). En cuanto a las proteínas HAT también se ha comprobado que formas aberrantes generadas por translocaciones cromosómicas son responsables de ciertos tipos de leucemia (Marmorstein y Roth, 2001). Esta clara relación entre acetilación/desacetilación de histonas y desarrollo de tumores, hace cobrar importancia al estudio de los inhibidores de la actividad histona desacetilasa como agentes terapéuticos y carcinoprotectores.

1.4.2.1. Inhibición de la actividad HDAC

El dominio catalítico de las HDAC está compuesto por una secuencia de 390 aminoácidos muy conservada. El centro activo presenta un bolsillo tubular curvado y

ensanchado en el fondo. La eliminación del grupo acetilo se realiza a través de un sistema de transmisión de carga formado por dos residuos de histidina adyacentes, dos residuos de aspártico y un residuo de tirosina. Un componente esencial del sistema es un ión Zn^{2+} , cuyo sitio de unión se encuentra en el fondo del bolsillo. Los inhibidores de la actividad histona desacetilasa actúan quelando el Zn^{2+} presente en el bolsillo catalítico, como en el caso de los ácidos hidroxámicos, benzamidas, y los ácidos carboxílicos, o bien reaccionando con él, como ocurre con los epóxidos (Bertrand, 2010).

Los inhibidores más potentes de la actividad histona desacetilasa son los ácidos hidroxámicos como la tricostatina A (TSA) o el ácido suberoilanolido hidroxámico (SAHA), que actúan *in vitro* a concentraciones nanomolares y micromolares. Su estructura consiste en una cadena alifática que permite la entrada en el bolsillo catalítico. El grupo ácido quela el ion Zn^{2+} , mientras que la región más voluminosa de la molécula actúa taponando el bolsillo. Entre los ácidos carboxílicos destacan el ácido valproico y los ácidos grasos de cadena corta como el propiónico, acético y butírico. Los ácidos carboxílicos inhiben la actividad HDAC de forma reversible y son menos potentes que los ácidos hidroxámicos, actuando *in vitro* a concentraciones milimolares (Monneret, 2005). Mientras que la TSA actúa como un inhibidor competitivo, el butirato lo hace como inhibidor no competitivo, siendo necesarias dos moléculas de este último para ocupar el bolsillo catalítico de la enzima (Davie, 2003).

Numerosos estudios han demostrado que los inhibidores de HDAC son capaces de frenar la proliferación celular e inducir diferenciación y apoptosis en un amplio espectro de células tumorales (Marks y col., 2003). No en vano, en la actualidad se están desarrollando numerosos estudios clínicos en el tratamiento de diferentes tipos de tumores a través del uso de estos inhibidores (Ma y col., 2009; Tan y col., 2010). Una de las principales razones que apoyan el estudio de estos compuestos como agentes antitumorales es su acción preferencial sobre células transformadas a concentraciones a las cuales no se detecta efecto sobre las células normales (Herold y col., 2002; Henderson y col., 2003). Se ha propuesto que los efectos antitumorales de los inhibidores de HDAC se deben a la reactivación de genes supresores de tumores en células transformadas (Cress y Seto, 2000). La presencia de estos inhibidores altera el balance entre las actividades HAT y HDAC, lo que se traduce en una hiperacetilación de histonas que, como ya se ha mencionado previamente, provoca cambios en la estructura de la cromatina favoreciendo la transcripción en términos que promueven parada de ciclo celular, diferenciación y apoptosis (Peserico y Simone, 2011). También

es esencial su papel regulador sobre el estado de acetilación de varias proteínas no histonas implicadas en procesos de regulación de la transcripción, como p53, STAT3 o c-myc (Yao y Yang, 2011). Pero no todos los genes responden modificando su expresión en presencia de inhibidores de HDAC, sino que sólo lo hace un reducido número de ellos (Mariadason y col., 2000). El modo en que estos agentes actúan sobre genes específicos no es del todo conocido, siendo esencial el estudio de los mecanismos que regulan dicho proceso para el futuro desarrollo de tratamientos eficaces, tanto paliativos como preventivos, frente a diferentes tipos de tumores.

1.4.2.2. Regulación de la expresión génica por inhibidores de HDAC

Los mecanismos a través de los cuales las HDAC son capaces de regular la expresión génica son esencialmente tres: (1) Alteración de la estructura de la cromatina por desacetilación de histonas, (2) generación de sitios de reconocimiento para proteínas no histonas, y (3) desacetilación de proteínas no histonas alterando así su actividad o su capacidad de unión al sustrato. Teniendo en cuenta estas premisas puede plantearse la posibilidad de que los inhibidores de HDAC afecten a la expresión génica actuando a cualquiera de estos tres niveles.

La acetilación de las lisinas de las histonas genera una estructura relajada o abierta que permite la unión de proteínas que interaccionan con el DNA, y cuya función puede estar relacionada con reparación, replicación o transcripción. Para explicar cómo los inhibidores de HDAC son capaces de regular la expresión de un porcentaje de genes específicos tan pequeño a través de un mecanismo tan general, se debe recurrir a la existencia de elementos de respuesta a estos agentes en la secuencia promotora de los genes diana. Uno de los inhibidores de HDAC sobre el que más estudios se han realizado al respecto es el butirato. Se ha descrito la presencia teórica de elementos de respuesta a butirato (BRE, *butyrate response element*) en la región promotora de ciertos genes. Los primeros datos descritos corresponden a estudios del virus HIV-1 (Bohan y col., 1989) donde el tratamiento con butirato estimula la replicación del virus en células HeLa. Análisis mutacionales permitieron descubrir la existencia de dos regiones de respuesta a este agente en el LTR (*Long Terminal Repeat*) del virus. Pudo observarse la presencia de dos sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 en una de las secuencias de respuesta a butirato, que previamente habían sido descritos como esenciales en la actividad transcripcional del promotor. Mutaciones dirigidas en estos

sitios de unión de Sp1 disminuían la expresión génica inducida por butirato. Posteriormente se localizaron secuencias homólogas en el promotor del gen de la proteasa de citotoxicidad celular CCP1 en linfocitos T (Fregeau y col., 1992), en el de la calbindina-D28k (Gill y Christakos, 1993), y en el de IGFBP-3 (*IGF binding protein 3*) (Walker y col., 2001).

Se ha comprobado que prácticamente todos los inhibidores de HDAC incrementan la expresión de p21 (Villar-Garea y Esteller, 2004). Esta proteína tiene como función parar el ciclo celular en fase G1 o S a través de mecanismos dependientes o independientes de p53. Para ello forma complejos cuaternarios con la ciclina A, Cdk2 y PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), inhibiendo la actividad de quinasa las proteínas Cdk (Harada y Ogden, 2000). Su papel en el ciclo celular, así como su expresión regulada por butirato, convirtieron a su promotor en un buen candidato para la búsqueda de elementos de respuesta a este agente. De hecho, existen sitios de unión para Sp1 y Sp3, responsables de los efectos del butirato y de la TSA sobre la transcripción (Nakano y col., 1997). Los sitios Sp1/Sp3 en el promotor de $p21^{WAF1}$ se corresponden con cajas ricas en GC, siendo también esencial la presencia de p300 en la función reguladora de estos factores sobre la transcripción (Xiao y col., 2000).

Otro de los factores implicados en la regulación de la expresión de $p21^{WAF1}$ es ZBP-89 (*Zinc-finger binding protein 89*). p300 se asocia directamente con ZBP-89 formando un complejo regulador del que también forma parte Sp1. Este complejo se une a las cajas ricas en GC presentes en el promotor, ejerciendo allí su función reguladora de la transcripción. ZBP-89 parece actuar como proteína de anclaje que permite la interacción indirecta entre Sp1 y p300 (Bai y Merchant, 2000). Además, es capaz de incrementar la expresión por mecanismos dependientes de p53, uniéndose a él y estabilizándolo (Merchant y col., 2003). De este modo bloquea la salida de p53 al citoplasma, donde sería degradado por el proteasoma, incrementando la vida media de p53, que permanece en el núcleo pudiendo regular así sus genes diana, entre los que se encuentra $p21^{WAF1}$ (Bai y Merchant, 2001). Además se ha comprobado que ZBP-89 es capaz de reclutar y activar a la quinasa ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), que tiene un papel esencial en la respuesta a inhibidores de HDAC. La unión de dicha quinasa a las cajas ricas en GC del promotor de $p21^{WAF1}$ es dependiente de p300 y ZBP-89, pero no de Sp1 (Bai y col., 2006). También se ha observado que ZBP-89 reprime la transcripción del gen de la vimentina a través de su interacción con Sp1 (Zhang y col.,

2003), mientras que es capaz de activar la expresión del gen de la fosfatasa alcalina intestinal (Malo y col., 2006).

Además de las cajas ricas en GC, con sitios de unión Sp1/Sp3, se ha demostrado también la importancia de las cajas CCAAT en la regulación de la expresión génica en respuesta a inhibidores de HDAC. Algunos ejemplos de genes donde se han descrito elementos de respuesta a butirato con esta secuencia son los de la β -globina (Gordon y col., 2005) o el de la tirosina hidroxilasa (Patel y col., 2005). Se ha descrito la unión de varios factores de transcripción a esta secuencia, como son NF-Y, GATA-1 y C/EBP. Las cajas CCAAT siempre se encuentran flanqueadas por al menos un elemento promotor funcionalmente importante. Se ha demostrado que NF-Y incrementa considerablemente la afinidad por el DNA de otros factores de transcripción vecinos haciendo ambos complejos mucho más estables, como en el caso de Sp1, SREBP1 o RF-X (Mantovani, 1999). También se ha comprobado que la RNA polimerasa II se une a todos los promotores de los genes con cajas CCAAT de manera dependiente de NF-Y, y que éste se asocia con la proteína TBP (*TATA binding protein*) y a varios factores asociados a TBP (TAF, *TBP associated factors*), e interacciona con las HAT p300/CBP, PCAF y Gcn5 (Kabe y col., 2005).

1.4.2.3. Acetilación de proteínas no histona

Otro de los mecanismos esenciales a través de los cuales los inhibidores de HDAC ejercen su función reguladora de la expresión génica es a través de los niveles de acetilación/desacetilación de diferentes proteínas no histonas. La acetilación postraducciona de lisinas genera un apantallamiento de cargas positivas y, por tanto, altera las propiedades electrostáticas de la proteína. Este hecho puede afectar tanto a su actividad como a su capacidad de interacción con el sustrato, pudiendo también desempeñar un papel esencial en la estabilidad proteica (Spange y col., 2009).

Uno de los factores de transcripción en el que más se ha profundizado acerca de estas modificaciones postraduccionales es la proteína p53. Una gran variedad de señales de estrés celular promueven la estabilidad de p53, su acumulación en el núcleo y su activación. Esto se traduce en la parada del ciclo celular en fase G1/S o G2/M, o bien conduce a la entrada de la célula en apoptosis. p53 presenta en su región central un dominio de unión a DNA, y un dominio de activación transcripcional en el N-terminal. En el extremo C-terminal de la proteína se ubican las señales de localización nuclear y

el dominio de tetramerización (Brady y Attardi, 2010). Este factor sufre numerosas modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación, glicosilación y ubiquitinación, que son fundamentales en todos los mecanismos de respuesta a estrés. p53 se acetila por CBP/p300 en siete residuos de lisina (K305, K370, K372, K373, K381, K382, K386) del extremo carboxilo terminal, y en uno del dominio de unión al DNA (K164), mientras que la lisina K320 es acetilada por PCAF, y la K120 por Tip60/hMOF (Meek y Anderson, 2009). Diferentes estudios ponen de manifiesto que la acetilación de p53 por CBP/p300 en lisinas del extremo C-terminal es fundamental tanto para su unión al DNA como para su actividad reguladora de la transcripción (Dai y Gu, 2010). Uno de los principales papeles de la acetilación de p53 es el incremento de su estabilidad; la acetilación de lisinas en el extremo C-terminal de p53 es esencial para evitar su degradación mediada por la ubiquitina-ligasa MDM2 (*Murine Double Minute 2*) (Lavin y Gueven, 2006). Esto se debe a que los residuos de lisina que son ubiquitinados en el extremo C-terminal de p53 son los mismos que se acetilan tras respuesta a estrés celular. Por otra parte, la acetilación de la lisina K320 parece incrementar la supervivencia celular por activación de genes diana implicados en la parada del ciclo celular (Knights y col., 2006). En cambio, se ha comprobado que la acetilación de la lisina K120 es esencial en la activación de genes implicados en apoptosis pero no en ciclo celular, y se ha propuesto que la acetilación en este residuo es fundamental para que p53 pueda desplazar de forma adecuada a la proteína proapoptótica Bak de su interacción con Mcl-1 (Sykes y col., 2009). El equilibrio en la acetilación de p53 se mantiene principalmente por desacetilación a través de HDCA1 y SIRT1 (Dai y Gu, 2010).

Existen más ejemplos de proteínas no histonas reguladas por acetilación, como el factor de transcripción STAT3 que participa en la ruta de señalización por citoquinas. STAT3 se encuentra de forma latente en el citoplasma y su dimerización es necesaria para activarse y entrar en el núcleo. Tras el tratamiento con citoquinas, CBP/p300 acetila a STAT3 en la K685 promoviendo así su dimerización, incrementado su unión al DNA y potenciando su actividad transactivadora (Glozak y col., 2005). También un gran número de receptores nucleares están regulados por acetilación, como es el caso de E2F, que pertenece a una familia de factores de transcripción implicados en el control del ciclo celular, la replicación del DNA y en proliferación celular. E2F se acetila a través de CBP/p300 y PCAF, lo que incrementa su capacidad de unión al DNA y estimula su actividad transcripcional (Marzio y col., 2000). Uno de los mecanismos de

regulación de la actividad del factor de transcripción NF- κ B consiste en la regulación de su localización subcelular a través de la proteína I κ B. La acetilación por CBP/p300 de diferentes lisinas de NF- κ B regula su capacidad de interacción con I κ B, además de su afinidad por el DNA y su actividad transcripcional (Quivy y Van Lint, 2004).

Otros muchos factores de transcripción son regulados por acetilación como es el caso de MyoD, c-Myc, GATA-1, EKLF y receptores de andrógenos y estrógenos (Spange y col., 2009). También son diana de acetilación algunas proteínas no implicadas directamente en la transcripción como la α -tubulina, que es desacetilada por HDAC6 y SIRT2, regulando así el proceso de polimerización de los microtúbulos y todos los fenómenos de motilidad celular (Perdiz y col., 2011). Ku70 es una proteína implicada en la reparación de roturas de doble hebra en el DNA, que juega un papel esencial en la apoptosis. Tras daño en el DNA su nivel aumenta e interacciona con Bax, impidiendo su translocación a la mitocondria y frenando así el proceso de apoptosis. La acetilación de Ku70 por CBP/p300 en las lisinas K539 y K542 impide la interacción con Bax, promoviendo así su liberación, localización en la mitocondria y activación del proceso apoptótico (Cohen y col., 2004). Todos estos datos ponen de manifiesto la complejidad en la regulación de proteínas no histonas por acetilación en residuos de lisina. La Figura 5 resume estos diferentes procesos celulares regulados por HDAC.

1.5. METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ

El correcto remodelado de la matriz extracelular y la interacción de las células con ella son dos fenómenos esenciales en numerosos procesos fisiológicos como el desarrollo, la morfogénesis, y el mantenimiento de la estructura de los tejidos. Esto supone que la degradación de la matriz extracelular debe estar perfectamente controlada en condiciones fisiológicas, y cualquier alteración se relaciona con numerosas enfermedades como la artritis, las úlceras crónicas, la fibrosis o el cáncer. Entre toda la maquinaria celular encargada de este proceso de degradación destacan las enzimas proteolíticas de la familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMP; *Matrix Metalloproteinase*). Las MMP son una familia de endopeptidasas dependientes de Zn^{2+} y Ca^{2+} que son activas a pH neutro. La primera actividad MMP descubierta corresponde a la collagenasa (MMP-1), habiéndose identificado actualmente 24 miembros de esta familia MMP en vertebrados, 23 de ellas presentes en humanos (Klein y Bischoff, 2011). Las MMP generalmente están constituidas por un prodominio, un dominio

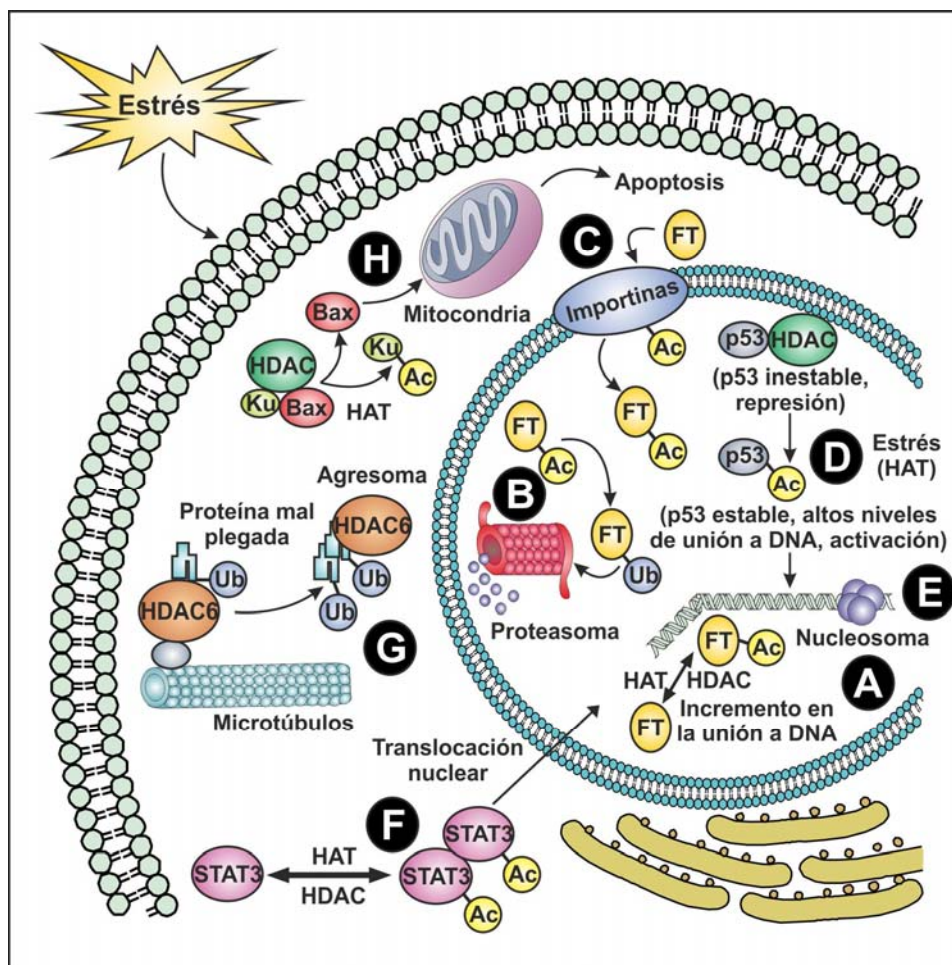


Figura 5. Esquema general de los diferentes procesos celulares regulados por las HDAC.

La figura muestra una lista parcial de diferentes procesos biológicos cuyo mecanismo está regulado por acetilación. (A) La acetilación puede regular la unión de diferentes factores de transcripción al DNA; (B) la estabilidad proteica está influida por las HAT y las HDAC, ya que las lisinas pueden estar sujetas tanto a acetilación como a ubiquitinación; (C) la entrada y salida de proteínas en el núcleo está regulada por acetilación de las importinas, componentes de la envoltura nuclear; (D) múltiples funciones de p53 están reguladas por acetilación; (E) la accesibilidad al nucleosoma está también regulada por las HAT y las HDAC; (F) la acetilación del factor de transcripción STAT-3 induce su dimerización y translocación al núcleo; (G) se requiere la HDAC6 para el correcto reclutamiento de las proteínas mal plegadas al agrosoma; (H) la translocación de Bax a la mitocondria está influenciada por la acetilación de la proteína Ku70 asociada al daño en el DNA. (FT: factor de transcripción; Ac: acetilación; Ub: ubiquitinación).

catalítico, una región visagra y un dominio hemopexina. La mayor parte son secretadas al exterior celular, aunque algunas de ellas pueden quedar ancladas a la membrana por una región transmembrana de tipo I. Las MMP se sintetizan en forma de pre-proenzimas; tras la eliminación del péptido señal la proenzima se secreta al exterior celular, permaneciendo latente debido al mantenimiento del prodominio en el extremo N-terminal. En el extremo C-terminal de las MMP se localiza el dominio hemopexina,

estabilizado por un puente disulfuro entre dos cisteínas cercanas, y cuya función principal es determinar la especificidad por el sustrato. Tanto las MT-MMP (*Membrane-type MMP*) como las MMP-11, -21 y -28, presentan un dominio adicional en la región C-terminal del propéptido que es reconocido por serínproteasas de tipo furina, de modo que estas MMP pueden activarse intracelularmente (Murphy y Nagase, 2008).

Las MMP pueden activarse *in vitro* mediante el uso de agentes químicos modificadores de grupos tiol, SDS, o agentes caotrópicos. Un pH ácido o el tratamiento con calor también permiten alcanzar esta activación. *In vivo* el principal mecanismo de activación está mediado por proteasas, entre las que destaca la plasmina. Esta proteasa se genera a partir del plasminógeno a través del activador de plasminógeno o del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa. Ambos se encuentran asociados a membrana, lo que permite una activación de las MMP localizadas en la matriz extracelular (Kessenbrock y col., 2010). Una vez activas, las MMP pueden participar en la proteólisis del prodominio y consiguiente activación de otras MMP. La actividad de las MMP también se encuentra estrechamente regulada por dos tipos principales de inhibidores endógenos: (1) inhibidores de proteasas no específicos como la α 2-macroglobulina o la α 1-antiproteasa, y (2) los inhibidores titulares de MMP (TIMP; *Tissue inhibitor of metalloproteinases*). Estos tienen forma de cuña de modo que encajan en el centro activo de la misma forma que lo hace el sustrato, y su unión con las MMP con una estequiometría 1:1 no es covalente (Brew y Nagase, 2010).

La expresión tisular de la mayoría de las MMP es normalmente baja, siendo inducida en aquellos lugares y situaciones en los que se requiere el remodelado de la matriz extracelular. La expresión de las MMP se encuentra principalmente regulada a nivel transcripcional, aunque también se puede modular la estabilidad de su mRNA (Clark y col., 2008). Las regiones promotoras de los genes *MMP* contienen elementos reguladores muy conservados, y su expresión puede inducirse a través de diferentes factores de transcripción, respondiendo a citoquinas o a factores ambientales como el contacto con la matriz extracelular (Vincenti y Brinckerhoff, 2007; Yan y Boyd, 2007). Varias rutas mediadas por factores de crecimiento y citoquinas convergen en el sitio de unión para el factor de transcripción AP-1. Este elemento de respuesta se sitúa aproximadamente en posición -70 del promotor de estos genes y une homodímeros o heterodímeros de oncoproteínas de las familias Fos y Jun. Aunque se ha comprobado la activación de la expresión de la MMP-1 por AP-1, el efecto contrario ha podido

demostrarse por acción de glucocorticoides sobre varios miembros de la familia MMP. El mecanismo de supresión transcripcional por glucocorticoides implica la unión del receptor de estos a la proteína Jun, de forma que Jun no es capaz de unirse al sitio AP-1 e inducir la expresión del gen diana (Chakraborti y col., 2003). Existe también un sitio PEA3 en la mayoría de los promotores de las MMP. A esta secuencia se unen miembros de la familia de oncoproteínas ETS. Las proteínas ETS no suelen dimerizar para unirse al DNA, aunque normalmente forman complejos con otros factores de transcripción como AP-1. Se ha demostrado que los sitios AP-1 y PEA3 cooperan a la hora de incrementar la transcripción, aunque la presencia de otros elementos como sitios de unión para NF- κ B o Cbfa1 es también necesaria para regular de forma precisa la expresión de los genes MMP en tejidos específicos (Folgueras y col., 2004).

A pesar de la estrecha regulación tanto de su expresión como de su actividad, las MMP se relacionan con numerosas patologías, habiéndose demostrado ampliamente su implicación en procesos carcinogénicos. Las MMP pueden favorecer el desarrollo tumoral no sólo a través de la degradación de la matriz extracelular circundante, sino también por liberación de factores de crecimiento encriptados en la matriz extracelular o por la generación de fragmentos bioactivos. Además esta actividad proteolítica rompe las interacciones célula-matriz y célula-célula. Esto supone que las MMP no sólo inducen el crecimiento del tumor, sino que también incrementan la invasividad de las células cancerosas, y juegan un papel esencial en el proceso de angiogénesis (Deryugina y Quigley, 2010). En este sentido existen numerosos estudios que ponen de manifiesto la relación entre las MMP y los fenómenos de progresión tumoral. Se ha comprobado que una expresión elevada de varias MMP, tanto en tumores primarios como en metástasis, se correlaciona con un incremento de la progresión tumoral, con un aumento de la invasividad y de la metástasis a órganos secundarios con un mal pronóstico (Deryugina y Quigley, 2006).

La actividad proteolítica de las MMP contribuye a la formación de un microambiente complejo que promueve la transformación maligna en estados tempranos del tumor (Kessenbrock y col., 2010). De esta forma las MMP son capaces de activar factores de crecimiento, suprimir la apoptosis de las células tumorales, eliminar los gradientes de citoquinas generados por el sistema inmune, o liberar factores angiogénicos. El efecto inductor del crecimiento tumoral ejercido por las MMP se debe principalmente a su actividad proteolítica sobre proteínas que no forman parte de la matriz extracelular. Así se ha comprobado que las MMP permiten la liberación de

factores de proliferación celular como IGF y actúan sobre diferentes rutas de señalización, como la del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-1) (Levi y col., 1996; Manes y col., 1997). Pero, probablemente, la ruta de señalización mejor estudiada en estos procesos de tumorigénesis inducida por MMP es la del factor TGF- β . Aunque este factor ejerce generalmente una actividad supresora de tumores, en estados avanzados de la enfermedad puede generar efectos diametralmente opuestos, comportándose como agente promotor de tumores y favoreciendo procesos metastásicos (Massague, 2008). En este sentido, TGF- β deriva de una forma inactiva que sufre una conversión proteolítica a través de furinas u otras proteasas para dar lugar a la molécula biológicamente activa. Así, se ha demostrado que las MMP-2, -9 y -14 pueden activar proteolíticamente a TGF- β favoreciendo tanto el desarrollo del tumor como fenómenos de invasividad y metástasis (Yu y Stamenkovic, 2000; Mu y col., 2002).

Otra actividad procarcinogénica de las MMP deriva de su capacidad para inhibir los procesos de apoptosis. En este sentido se ha demostrado que la MMP-7 degrada al ligando Fas que está unido a la membrana, de modo que es capaz de generar quimiorresistencia por insensibilización de las células tumorales a ciertos tratamientos que inducen la ruta extrínseca de apoptosis (Mitsiades y col., 2001). Por otra parte algunas MMP se han asociado con mecanismos de escape de las células tumorales frente al sistema inmune del individuo; por ejemplo la MMP-9 es capaz de suprimir la proliferación de los linfocitos T (Sheu y col., 2001), y la MMP-11 disminuye la sensibilidad de las células tumorales por las células NK (*Natural Killer*) (Kataoka y col., 1999). También se ha demostrado la implicación de diferentes MMP en fenómenos de angiogénesis, como en el caso de la MMP-9, que se comporta como un potente factor proangiogénico al facilitar la liberación de los factores VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) que se encuentra secuestrado en la matriz extracelular (Deryugina y Quigley, 2010).

1.5.1. MMP-11 (estromalisina-3)

La MMP-11 (estromalisina-3 o ST3) fue inicialmente descrita como un gen asociado al cáncer de mama (Basset y col., 1990). Normalmente se expresa de forma transitoria en células de origen mesenquimal, durante procesos asociados con el remodelado de tejidos o el desarrollo embrionario (Rio, 2005). Sin embargo la MMP-11 se expresa de forma anormal en la mayoría de los carcinomas humanos y se asocia con

la progresión tumoral y el mal pronóstico de la enfermedad (Wei y Shi, 2005). A pesar de pertenecer a la familia de las MMP, el único componente de la matriz extracelular que la MMP-11 es capaz de degradar es el colágeno de tipo VI (Motrescu y col., 2008), si bien actúa sobre otras dianas como la β -caseína, la proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBP-1; *insulin-like growth factor-binding protein-1*), la α 2-macroglobulina, inhibidores de serínproteasas (como el inhibidor α 1-proteinasa y la α 2-antiplasmina), y el receptor de laminina (Manes y col., 1997; Amano y col., 2005).

Se han descrito dos isoformas de la MMP-11 (α - y β -ST3) generadas por *splicing* alternativo y regulación a través de distintos promotores (Luo y col., 2002). La MMP-11 presenta una organización en dominios similar al resto de las MMP, y un dominio adicional, entre el prodominio y el dominio catalítico, que es reconocido por convertasas de tipo furina (Figura 6). Este dominio permite que la MMP-11 pueda activarse intracelularmente y ser secretada al exterior celular en su forma activa (Pei y Weiss, 1995). La isoforma α presenta todos estos dominios en su estructura, mientras que la isoforma β carece tanto del péptido señal como del prodominio, lo que supondría su expresión en forma constitutivamente activa y únicamente intracelular (Luo y col., 2002).

El gen *MMP-11*, de 11,5 Kb, contiene ocho exones y siete intrones. Los tres dominios N-terminal de la proteína (péptido señal, prodominio y dominio catalítico) se generan a partir de los 5 primeros exones. El exón 1 contiene el péptido señal y parte del prodominio, mientras que el exón 2 contiene el resto del prodominio y la porción N-terminal del dominio catalítico que se extiende de los exones 2 a 5. El dominio hemopexina está formado por cuatro exones compartidos con el dominio catalítico y la región 3' no traducible (Anglard y col., 1995). Los transcritos α - y β -MMP-11 son idénticos desde el exón 2 al ocho, diferenciándose únicamente en el primer exón en 5'. Como el sitio de inicio de la traducción y la secuencia que codifica para el péptido señal se encuentran en el primer exón de la isoforma α , ambas regiones están excluidas del cDNA de la isoforma β . El punto de inicio de la traducción de esta última se encuentra en la Met130 de la isoforma α , generándose una proteína de 359 aminoácidos y una masa molecular de 40,5 kDa. A diferencia de la isoforma β -MMP-11, la isoforma α presenta una pequeña región no traducida de 22 pb que precede a una región de 129 aminoácidos que codifica el péptido señal, el prodominio, el sitio de reconocimiento y activación por furina, y los 32 primeros aminoácidos del dominio catalítico (Luo y col., 2002). El tamaño del mRNA de la isoforma α -MMP-11 es de 2.260 pb, incluyendo una

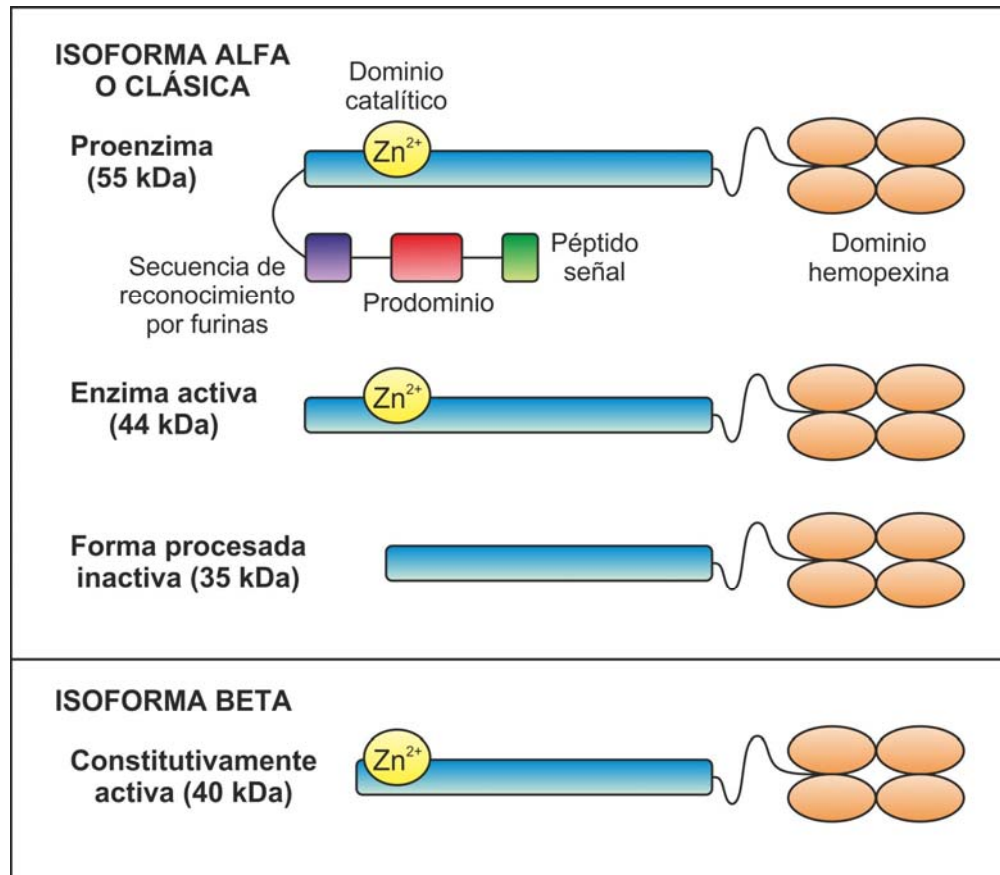


Figura 6. Esquema de las isoformas de la MMP-11.

La pre-proenzima α -MMP-11 no procesada presenta tanto el péptido señal, que dirige su salida al exterior celular, como el prodominio que la mantiene en forma latente. En esta región se localiza el sitio de reconocimiento para convertasas de tipo furina que permite su activación intracelular. La isoforma α procesada pierde tanto el prodominio como el péptido señal, disminuyendo su masa molecular de 55 a 44 kDa. Su posterior procesamiento da lugar a una proteína inactiva de 35 kDa. La isoforma β es sintetizada directamente en forma intracelular y constitutivamente activa, ya que carece de péptido señal, prodominio y varios aminoácidos del dominio catalítico, lo que reduce su masa molecular a 40 kDa.

región 5' no traducible de 22 pb y otra región 3' no traducible de 773 pb (Anglard y col., 1995). La masa molecular de la proenzima α -MMP-11 es de 55 kDa, mientras que se reduce a 44 kDa en su forma activa.

Estudios del promotor del gen *MMP-11* en ratón (Ludwig y col., 2000) y humano (Anglard y col., 1995) han desvelado la presencia de elementos de respuesta comunes con la mayoría de las proteínas de la familia MMP, como sitios AP1 y PEA3. En el promotor α -*MMP-11* se localizan de forma consecutiva la caja TATA y un elemento PEA3 entre los nucleótidos -39 y -27. También en posición -461 se encuentra un motivo de tipo AP1, que difiere en 1 pb de la secuencia consenso y se ha demostrado que no es funcional. Existen varias cajas GT y GC entre los nucleótidos -425 y -20, y un

elemento de respuesta a ácido retinoico (RARE; *retinoic acid response element*) en posición -385 (Anglard y col., 1995). Se ha descrito también la presencia de una secuencia de unión de C/EBP entre los nucleótidos -2169 y -2151 (Luo y col., 1999).

En cuanto al papel de la MMP-11 en carcinogénesis, se ha demostrado que altos niveles tanto de proteína como de mRNA se correlacionan con mal pronóstico de la enfermedad, y se ha descrito como marcador tumoral en suero (Ahmad y col., 1998; Yang y col., 2008). Aunque los mecanismos moleculares aún se desconocen, la actividad procarcinogénica de la MMP-11 parece depender directamente de su actividad proteolítica, como sugieren los estudios realizados *in vivo* con mutantes catalíticos de la enzima (Noel y col., 2000). Una hipótesis es que, dado que algunas de sus dianas catalíticas son inhibidores de proteasas, la MMP-11 puede incrementar el daño tisular por activación de otras MMP (Mari y col., 1998). Además, se ha propuesto que es capaz de inhibir la apoptosis en células de cáncer de mama regulando el control de la señal de insulina (Farrelly y col., 1999), y de promover la supervivencia celular favoreciendo el desarrollo de tumores en ratones (Noel y col., 1996).

1.6. ANEXINAS

Las anexinas son una familia de proteínas cuya principal característica es la capacidad para interactuar con fosfolípidos de forma dependiente de Ca^{2+} . Esta superfamilia proteica la constituyen más de 100 miembros diferentes con una amplia distribución taxonómica, expresándose en hongos, protistas, plantas y vertebrados superiores (Moss y Morgan, 2004). En mamíferos existen doce miembros que, de acuerdo con la nomenclatura aceptada, se denominan con la letra A (A1-A11 y A-13). Todas las anexinas comparten un núcleo proteico constituido por cuatro repeticiones (ocho en la anexina A6) de un motivo estructural de aproximadamente 70 aminoácidos. Cada uno de estos motivos está formado por 5 hélices α anfipáticas (A-E), de modo que las hélices A, B, D y E dan lugar a una superhélice dextrógira, mientras que la hélice C se localiza perpendicular a estas. Las cuatro repeticiones se conectan entre sí a través de pequeñas secuencias organizándose en torno a un poro central hidrofílico (Gerke y Moss, 2002). Esto da lugar a una estructura con forma de disco plano con una superficie ligeramente convexa en la que se localizan los dominios de unión a Ca^{2+} , y otra superficie cóncava donde se sitúa la región amino terminal. Estos sitios principales de unión a Ca^{2+} son los denominados de tipo II y presentan la secuencia consenso

(Leu/Met)-Lys-Gly-X-Gly-Thr-(X)₃₈-(Asp/Glu), si bien existen otros sitios adicionales de unión a Ca^{2+} a lo largo de la molécula. El Ca^{2+} que se une a estos motivos de tipo II es el principal responsable de la interacción con membranas biológicas por coordinación simultánea de los grupos carbonilo y carboxilo de la proteína con los fosfolípidos presentes en la membrana.

A diferencia de este núcleo proteico altamente conservado, el dominio N-terminal de las anexinas presenta una gran variabilidad tanto en longitud como en secuencia, y permite clasificarlas en diferentes grupos: las anexinas A3, A4, A5, A6, A8, A10 y A13a con una extensión N-terminal inferior a 20 aminoácidos; las anexinas A1, A2, A9 y A13b con una longitud entre 33 y 47 aminoácidos; y las anexinas A7 y A11 con más de 100 residuos de extensión. Esta región es responsable de la interacción con otros componentes celulares. Así, se ha descrito la interacción de anexinas no sólo con lípidos, sino también con proteínas de unión a Ca^{2+} de tipo mano-EF como las de la familia S100 (Miwa y col., 2008), proteínas del citoesqueleto como la actina (Hayes y col., 2004), y otros ligandos no proteicos como RNA o GTP (Bandorowicz-Pikula y col., 2003; Filipenko y col., 2004). Además el dominio N-terminal está sujeto a numerosas modificaciones postraduccionales y actúa como principal región reguladora de la actividad de estas proteínas (Gerke y Moss, 2002).

Las anexinas presentan una gran diversidad de funciones, gran parte de ellas relacionadas directamente con su capacidad para unir Ca^{2+} e interactuar con membranas biológicas (Gerke y col., 2005). En este sentido, se ha demostrado que diferentes miembros de esta familia pueden actuar como proteínas de andamiaje (*scaffold*), funcionando como organizadoras de la interfase entre el citoplasma (o citoesqueleto) y la superficie citosólica de la membrana plasmática (Rescher y Gerke, 2004). Por ejemplo, en células musculares se ha descrito que la organización de microdominios de tipo *lipid raft* es dependiente de la presencia de las anexinas A2 y A6 (Chasserot-Golaz y col., 2005; Cornely y col., 2011). De hecho, la capacidad de la anexina A2 para unir actina la convierte en una proteína esencial en diferentes procesos celulares asociados con la organización de dominios y estructuras en la membrana, como las uniones adherentes epiteliales, o a través de complejos con moléculas de adhesión que median la interacción célula-matriz o célula-célula (Rescher y col., 2008; Morel y col., 2009). Se ha propuesto que la célula es capaz de regular la organización de estos dominios de membrana por movilización del Ca^{2+} intracelular. La concentración intracelular de Ca^{2+} necesaria para inducir la translocación de las anexinas desde el

citoplasma a la membrana es diferente entre todos los miembros de esta familia proteica. Dependiendo del modo de movilización del Ca^{2+} , de la localización intracelular del mismo y de la naturaleza de su señal, las diferentes anexinas serán reclutadas a la membrana de manera independiente. Esto permite a las células responder a diversos estímulos experimentando reorganizaciones dinámicas de la membrana dependientes de las funciones estructurales de las anexinas (Gerke y col., 2005).

Otra de las funciones de las anexinas es la regulación del tráfico vesicular, y se consideran también elementos esenciales en los procesos de endocitosis, exocitosis y fagocitosis. Así, las anexinas A1, A2 y A6 se encuentran presentes en endosomas, habiéndose identificado a la anexina A2 como un componente importante en la formación de endosomas tempranos (Cubells y col., 2007; Law y col., 2009; Patel y col., 2011). Además, la anexina A2 se ha identificado como parte de un complejo chaperona que contiene caveolina-1 y ésteres de colesterol, facilitando el transporte de estos últimos desde las caveolas a las membranas internas (Cubells y col., 2008). En cuanto a la anexina A1, parece estar implicada en la internalización de endosomas multivesiculares y en la internalización del EGFR (White y col., 2006), mientras que la anexina A6 regula el transporte de colesterol e, indirectamente, la salida de caveolina desde el aparato de Golgi (Cubells y col., 2007). Por otra parte, las anexinas A2 y A7 están directamente implicadas en la exocitosis regulada por Ca^{2+} , habiéndose descrito su papel en la liberación de gránulos cromafines (Chasserot-Golaz y col., 1996; Caohuy y Pollard, 2002). Además, tanto la anexina A1 como la A2 se consideran componentes importantes en procesos de fagocitosis, si bien otras anexinas parecen estar también implicadas en procesos de fusión fagosomal, como la A6, A7 y A11, y se ha detectado la presencia de las anexinas A1 a A5 en fagosomas aislados de macrófagos (Pittis y col., 2003).

Se ha propuesto que las anexinas pueden funcionar como canales de Ca^{2+} , si bien existe cierta controversia al respecto puesto que no se conocen los mecanismos a través de los cuales pueden ejercer esta actividad. La primera anexina en la que se describió la actividad como canal de Ca^{2+} fue la A7, seguida posteriormente por la A5. Se ha sugerido que la mayoría de las anexinas pueden funcionar como canales de Ca^{2+} debido a su poro hidrofílico central, que supone una característica estructural común a todos los miembros de la familia (Gerke y Moss, 2002). Sin embargo los datos *in vivo* son escasos, y la idea general de que su interacción con la membrana es periférica supone que, a través de un mecanismo desconocido, las anexinas deben ser capaces de

desestabilizar los lípidos de la membrana. Pero para que las anexinas puedan unirse a las membranas debe existir una disponibilidad previa de Ca^{2+} . También se ha comprobado que, a medida que aumentan los niveles de Ca^{2+} , la anexina A5 se une de forma más compacta a la membrana, lo que genera un efecto estabilizador sobre esta. Todas estas observaciones generan dudas acerca de la capacidad de estas proteínas para actuar como auténticos canales de Ca^{2+} . Por otro lado, varios trabajos han puesto de manifiesto que condiciones de pH ligeramente ácidas pueden favorecer la unión de las anexinas a fosfolípidos de membrana de forma independiente de Ca^{2+} , como ocurre en el caso de la anexina B12 de *Hydra*, la cual es además capaz de insertarse en la membrana (Luecke y col., 1995).

Se han descrito también diferentes funciones para las anexinas a nivel extracelular, si bien no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual son externalizadas ya que no presentan secuencias señal que permitan dirigirlas hacia las rutas secretoras clásicas. Una de las funciones extracelulares mejor estudiadas es la capacidad antiinflamatoria de la anexina A1 mediada por interacción con receptores específicos (D'Acquisto y col., 2008). También se ha demostrado la capacidad de la anexina A2 para unir y activar plasminógeno en la superficie de células endoteliales (He y col., 2011), así como el efecto anticoagulante de la anexina A5 (Cederholm y Frostegard, 2005). Finalmente, se ha descrito también la localización nuclear de diferentes anexinas. Aunque no se conoce con exactitud la actividad que pueden ejercer las anexinas en el núcleo, sí se ha demostrado que la anexina A2 es capaz de unir RNA, lo que indica un posible papel en el transporte de RNA desde el núcleo (Filipenko y col., 2004).

1.6.1. Anexina A1

La anexina A1 fue el primer miembro descrito de la familia de las anexinas. Se identificó como un segundo mensajero derivado del tratamiento con glucocorticoides y fue denominada inicialmente *lipocortina* (Flower, 1986). Está compuesta por 346 aminoácidos y tiene una masa molecular de 38 kDa. La estructura ha sido determinada por cristalografía, observándose una especial configuración en la región N-terminal de la proteína donde la unión de Ca^{2+} promueve una reconfiguración estructural (Weng y col., 1993). La anexina A1 pertenece al grupo de anexinas con una región N-terminal corta, en la que se localizan dos hélices α anfipáticas que comprenden los residuos 18 a

27 y 2 a 17, mientras que los residuos 28 a 41 se dirigen del dominio I al IV, cerrando la estructura globular. La primera hélice interacciona con el dominio IV mientras que la segunda hélice se inserta en el dominio III desestructurando la hélice III D, de manera que queda desplegada como un bucle en la región convexa (Figura 7). Este modelo explica el hecho de que la interacción con calcio y fosfolípidos promueva un cambio en la estructura de manera que la extensión N-terminal es desplazada fuera del núcleo proteico.

La anexina A1 se encuentra predominantemente en células diferenciadas, especialmente las que pertenecen al sistema hematopoyético, como neutrófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos (Parente y Solito, 2004). Tras activación por diferentes estímulos, estas células movilizan la anexina A1 desde el citoplasma hacia la superficie celular y la secretan, de modo que puede actuar de forma autocrina o paracrina. Además, varios estudios han demostrado que los glucocorticoides incrementan los niveles de anexina A1 en estos tipos celulares. Se ha comprobado en macrófagos que el tratamiento con glucocorticoides promueve dos efectos sobre esta proteína: a corto plazo (minutos), la anexina A1 presente en la células es fosforilada, lo que promueve su secreción y, a largo plazo (18-24 horas), se incrementan sus niveles de mRNA por activación del promotor. Este último efecto parece ser específico de cada tipo celular, ya que mientras que este incremento en la transcripción se ha descrito en macrófagos y mastocitos, en linfocitos T los glucocorticoides promueven el efecto contrario, observándose una disminución en los niveles de mRNA (D'Acquisto y col., 2008).

Entre las funciones descritas para la anexina A1 destaca su actividad antiinflamatoria ya que inhibe varias enzimas relacionadas con la respuesta inflamatoria, como son la PLA₂, la COX-2 y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS; *inducible nitric oxide synthase*) (Lim y Pervaiz, 2007). Por otra parte, se ha demostrado en células de la microglía que la dexametasona y un fragmento de la región N-terminal de la anexina A1 son capaces de inhibir la síntesis de COX-2 e iNOS, así como la producción de prostaglandina E2 (PGE2) y óxido nítrico de manera dependiente de concentración (Parente y Solito, 2004). También se ha observado la sobreexpresión de COX-2 y PLA₂ en ratones *knockout* para la anexina A1 (Minghetti y col., 1999).

Por otra parte, tras ser secretada, la anexina A1 es capaz de unirse a su receptor en la superficie celular, lo que promueve entre otras respuestas, desadhesión celular e inhibición de la migración de leucocitos, promoviendo el bloqueo de la respuesta

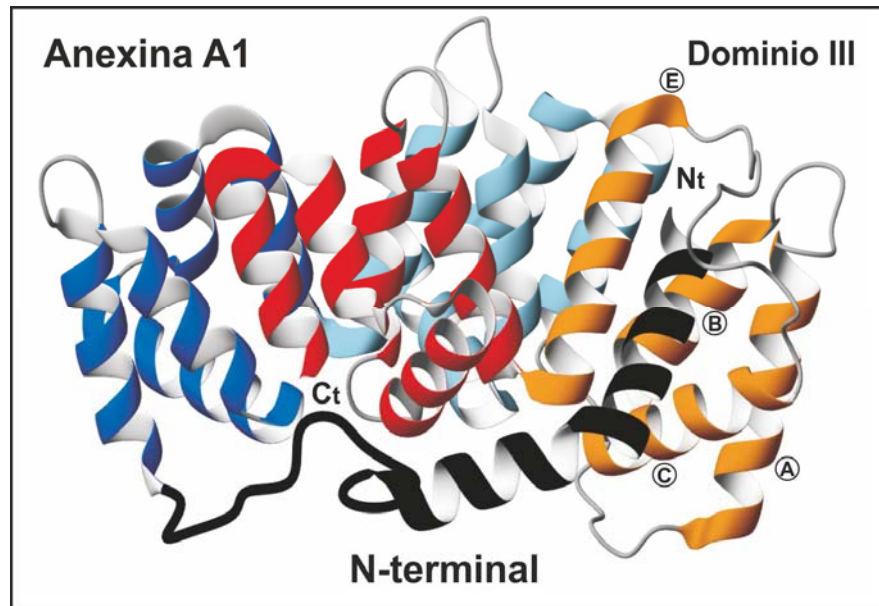


Figura 7. Estructura de la anexina A1 en ausencia de calcio.

Se representa la estructura tridimensional de la anexina A1 completa en ausencia de calcio (PDB 1MCX), remarcándose en color negro la extensión N-terminal. Ésta presenta dos hélices α anfipáticas consecutivas. La hélice 2-17 se inserta en el dominio III (coloreado en naranja), desplazando a la hélice IIID, que queda como un bucle en la superficie de la proteína (Rosengarth y col., 2001).

inflamatoria. Este receptor pertenece a la familia GPCR, con siete dominios transmembrana, y es conocido como receptor de péptidos formilados (FPR; *Formyl peptide receptor*). En humanos el receptor FPR-2 también es conocido como ALXR y es, a su vez, receptor para la lipoxina A_4 , un ligando endógeno antiinflamatorio (D'Acquisto y col., 2008). El empleo de inhibidores para este receptor ha permitido demostrar que la anexina A1 es capaz de reducir el daño producido por la extravasación de neutrófilos y otros leucocitos en modelos de isquemia-reperfusión cardíaca y mesentérica (Gavins y col., 2003; Ritchie y col., 2005), y en modelos de peritonitis inducida en ratones (Perretti y col., 2001). Además, se ha observado que la señal intracelular que se dispara tras unión de la anexina A1 al receptor ALXR promueve la fosforilación transitoria de ERK1/2, lo que se asocia con un rápido incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Perretti y D'Acquisto, 2009).

Otras evidencias del papel antiinflamatorio de la anexina A1 derivan del estudio de ratones *knockout* para esta proteína, donde se ha comprobado que existe una respuesta exacerbada en edemas o en peritonitis, así como una pérdida de la respuesta inhibitoria por glucocorticoides debido a un incremento en la migración de leucocitos (Hannon y col., 2003). Además, la anexina A1 es capaz de reducir la activación de los

linfocitos T y la migración de los eosinófilos frente a un estímulo alérgico (Kamal y col., 2001; Bach Knudsen y col., 2003; Liu y col., 2005). A otro nivel, también se ha comprobado que los macrófagos derivados de ratones *knockout* para esta proteína presentan una capacidad fagocítica disminuida debido a la menor expresión de CD11b, molécula clave en la adhesión a las partículas fagocitadas (Hannon y col., 2003). Cabe señalar que la expresión de anexina A1 se encuentra alterada en diversas enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, como en la fibrosis quística o en la inflamación crónica granulomatosa, poniendo de manifiesto la relación directa de esta anexina con procesos inflamatorios (D'Acquisto y col., 2008).

La anexina A1 no actúa únicamente como molécula antiinflamatoria, sino que es capaz de ejercer sus funciones a muchos otros niveles. Por ejemplo, se ha detectado su presencia en el núcleo, habiéndose propuesto que podría actuar como molécula desenrolladora del DNA por interacción con proteínas de la familia S100 (Zhu y col., 2010). Dada su capacidad para interaccionar con proteínas del citoesqueleto, principalmente la actina, la anexina A1 es también esencial en procesos de tráfico vesicular, estando implicada tanto en fagocitosis como en endocitosis y exocitosis (Futter y White, 2007). Por último, hay que mencionar su papel regulador del eje hipotálamo-hipófisis. En este sentido se ha comprobado que la anexina A1 inhibe la liberación de adenocorticotropina y prolactina a nivel adenohipofisario por efecto de la dexametasona (Taylor y col., 1995), y es capaz de inhibir la liberación de hormona del crecimiento a nivel del hipotálamo (Philip y col., 2001).

Pero la anexina A1 también es un regulador importante de la proliferación, diferenciación y muerte celular, estando por tanto implicada en tumorigénesis. Una de las funciones más interesantes de esta proteína sobre la proliferación es su papel como sustrato de diferentes quinasas, como la PKC o el EGFR. La fosforilación de la anexina A1 por el EGFR en la Tyr-21 incrementa su afinidad por Ca^{2+} y fosfolípidos (Schlaepfer y Haigler, 1987), pero también su sensibilidad a la degradación proteolítica (Haigler y col., 1987). Esta fosforilación parece ser importante en el proceso de endocitosis del propio EGFR, dado que la anexina A1 juega un papel fundamental en la formación de endosomas (White y col., 2006). Además, se ha propuesto que la anexina A1 presenta un dominio de homología src de tipo 2 (SH2) en su región N-terminal que le permite su unión a la proteína adaptadora Grb2, la cual constituye el nexo de unión entre el EGFR y la ruta de las MAPK (Croxtall y col., 2000). En este sentido se ha comprobado que la anexina A1 ejerce parte de sus efectos antiproliferativos por activación constitutiva de

ERK, lo que conlleva una disminución en la expresión de la ciclina D1 y alteraciones en el citoesqueleto (Alldridge y Bryant, 2003). Este efecto sobre la ruta de las MAPK parece ser específico del tipo celular ya que, en cáncer de próstata, se ha observado que la anexina A1 incrementa la actividad de p38 y JNK, mientras que no promueve cambios en ERK (Hsiang y col., 2006). En cualquier caso, estos eventos de señalización conducen igualmente a una disminución en la proliferación celular. La fosforilación de la anexina A1 por PKC se ha observado en diferentes tipos celulares, y se ha propuesto que regula tanto su procesamiento proteolítico como su translocación al núcleo (Kim y col., 2003). En hepatocitos se ha comprobado que la fosforilación de la anexina A1 está ligada a la señal proliferativa promovida por el factor de crecimiento hepático, de tal forma que la anexina actúa en este sistema como amplificadora de la señal proliferativa y de la quimiotaxis (Skouteris y Schroder, 1996). En cambio, la correlación entre el incremento en los niveles de anexina A1 y un mayor estado de diferenciación está ampliamente contrastada, especialmente en células del sistema hematopoyético.

Finalmente, la anexina A1 también está implicada en procesos apoptóticos y, por tanto, su expresión se ha relacionado con procesos tumorigénicos. Por un lado, se han detectado niveles elevados de esta proteína en diferentes tipos de tumores, como en hígado y páncreas, probablemente debido a un efecto proliferativo (Bai y col., 2004; Clifton y col., 2006). También se ha identificado como un factor proinvasivo y metastásico en cáncer de pulmón, y de cabeza y cuello (Wu y col., 2002; Jiang y col., 2003). En cambio, se ha descrito que la expresión de anexina A1 se encuentra disminuida en otros tipos de tumores, como en próstata, esófago o mama (Hu y col., 2004; Patton y col., 2005; Shen y col., 2005), sugiriendo una potencial capacidad antiproliferativa. En este último tipo de tumores se ha demostrado que además es capaz de atenuar tanto la transición epitelio-mesénquima como el proceso metastásico. Un ejemplo de estos efectos aparentemente contradictorios puede observarse en monocitos. Por un lado, se ha relacionado la sobreexpresión de anexina A1 con la inducción de apoptosis por TNF- α y etopósido (Canaider y col., 2000). En cambio, también se ha propuesto que la anexina A1 promueve la resistencia de los monocitos frente a la apoptosis inducida por TNF- α y que los niveles de esta proteína son constitutivamente superiores en células resistentes respecto a las células sensibles (Wu y col., 2000). Un efecto parecido se ha observado en células MCF-7, donde la transfección con anexina A1 promueve resistencia frente a adriamicina y etopósido (Solito y col., 2001). Por tanto, el papel de la anexina A1 tanto en apoptosis como en progresión tumoral no es

claro, aunque puede afirmarse que es altamente dependiente del tipo celular y, muy probablemente, del estado de diferenciación.

1.6.2. Anexina A5

La anexina A5 fue inicialmente aislada a partir de placenta humana y poco después detectada en vasos sanguíneos (Boersma y col., 2005). Dadas sus propiedades anticoagulantes se le denominó proteína vascular anticoagulante α (VAC- α) o proteína anticoagulante placentaria 1 (PAP-1). Está constituida por 317 aminoácidos y tiene una masa molecular de 36 kDa. Fue el primer miembro de la familia de las anexinas de mamífero cuya estructura tridimensional se determinó cristalográficamente (Figura 8). Presenta el dominio N-terminal más corto de toda la familia (15 aminoácidos), siendo este esencial para su actividad como canal de Ca^{2+} . Además es también el miembro de la familia con mayor afinidad por la fosfatidilserina (PS), por lo que se utiliza como marcador de externalización de este fosfolípido en procesos apoptóticos (Gerke y col., 2005). Aunque su localización es citosólica, se dirige hacia la membrana citoplasmática o nuclear tras un incremento intracelular de los niveles de Ca^{2+} . Se ha observado que durante la activación plaquetaria, la anexina A5 se transloca a la membrana plasmática e interacciona con el citoesqueleto por unión directa a la actina (Tzima y col., 2000). Dicha interacción con el citoesqueleto también se traduce en un papel regulador de procesos relacionados con formación de vesículas, de modo que se ha observado que la anexina A5 inhibe la endocitosis y promueve la autofagia en las células HEK293T humanas en condiciones de estrés nutricional (Ghislat y col., 2012). Además se ha propuesto que puede funcionar como proteína de andamiaje dada su abundancia relativa en algunos tipos celulares y a que es capaz de formar trímeros por unión con Ca^{2+} y membranas. Ello estabiliza dichas membranas y genera cambios en su curvatura y en la forma de la célula (Gerke y Moss, 2002). Además, la anexina A5 es capaz de interaccionar con diferentes componentes de la matriz, como el colágeno (Genge y col., 2007). Por otro lado, diversos estímulos pueden inducir su translocación al núcleo, como el estrés oxidativo, la activación por suero o la señalización por tirosina quinasas (Mohiti y col., 1997).

En relación a su función como proteína anticoagulante extracelular, se ha propuesto un modelo en el que la proteína forma una especie de cristal bidimensional por unión a los fosfolípidos de la superficie celular actuando a modo de escudo,

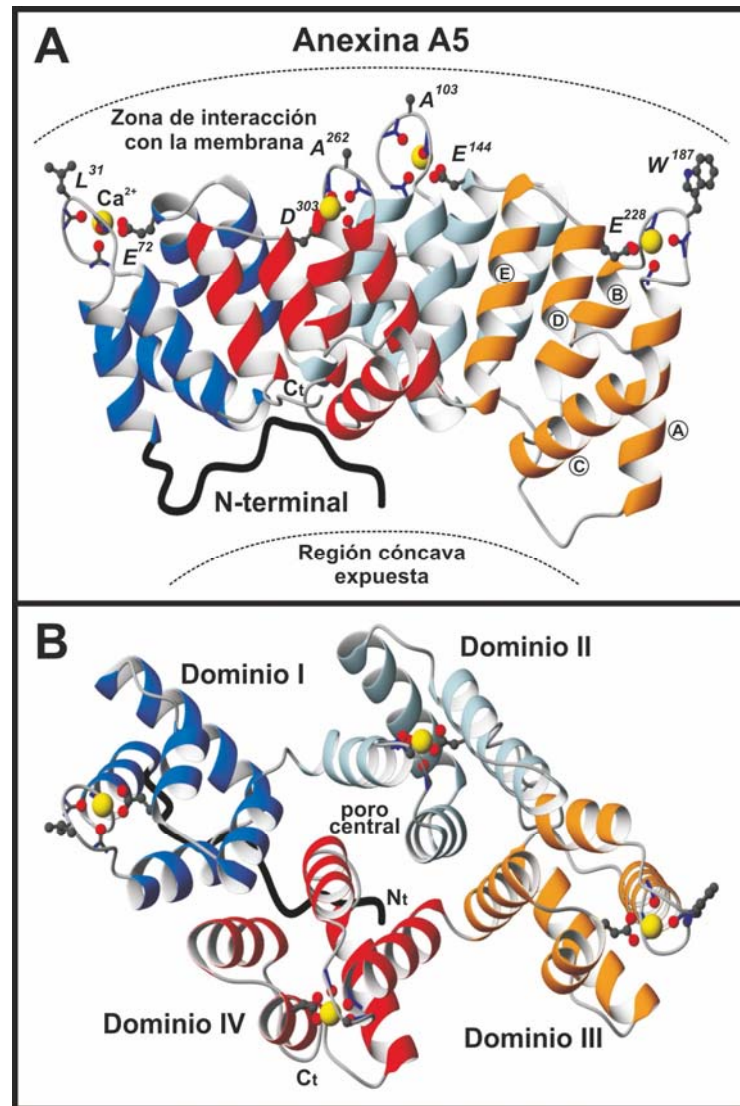


Figura 8. Estructura tridimensional de la anexina A5.

El dominio conservado de las anexinas presenta un plegamiento conservado en todas las proteínas de la familia, mientras la región N-terminal puede presentar diferentes configuraciones gracias a la variabilidad de su secuencia. Este extremo N-terminal se recoge en negro con los dominios I, II, III y IV en azul marino, azul celeste, naranja y rojo, respectivamente. Se presenta una visión lateral (A) y otra superior (B), mostrándose los sitios de unión de calcio de tipo II en amarillo junto con los principales residuos implicados en la interacción. En el dominio III se indican las hélices a de la A a la E. Las figuras se han preparado empleando el programa MOLMOL (Koradi y col., 1996) a partir de los datos de la anexina A5 humana del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) (Fichero PDB 1A8A) (Swairjo y col., 1995).

secuestrando a los fosfolípidos de los factores proteicos circulantes que los emplean en su cascada de coagulación (Gerke y Moss, 2002). En este sentido se ha observado la inhibición mediada por anticuerpos de la actividad anticoagulante de la anexina A5 tanto en pacientes con síndrome antifosfolipídico y lupus eritematoso, así como tras abortos recurrentes (Sato y col., 1999). La anexina A5 interacciona también con la

superficie apical de los trofoblastos sincitiales placentarios. Dichas superficies promueven la coagulación, lo que supone que el enmascaramiento de éstas por unión de la anexina facilita el flujo sanguíneo en la placenta, habiéndose observado en pacientes con síndrome fosfolipídico que la presencia de anticuerpos frente a la anexina A5 provoca trombosis placentaria (Rand, 2000). Cabe señalar que la capacidad de la anexina A5 para interaccionar con fosfatidilserina le otorga también un papel como inhibidor de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por los macrófagos. Este efecto se intensifica por la capacidad que tiene esta proteína para inducir la internalización de regiones de membrana ricas en fosfatidilserina (Kenis y col., 2006). Por otra parte, y al igual que en el caso de la anexina A1, se ha comprobado que la anexina A5 es capaz de inhibir la actividad de la PLA₂, lo que puede traducirse en un efecto antiinflamatorio (Buckland y Wilton, 1998). Otro potencial efecto protector de esta proteína proviene de estudios en tejido pancreático ya que la anexina A5 interacciona de forma directa con proteínas amiloidogénicas reduciendo su toxicidad (Bedrood y col., 2009). Esto podría vincularse con un papel protector en diferentes enfermedades relacionadas con la formación de depósitos amiloides, como el Alzheimer, el Parkinson, la corea de Huntington o la diabetes tipo II. Finalmente, la anexina A5 también se ha descrito como un inhibidor de la proteína PKC, lo que hace suponer un potencial papel en la regulación de procesos de señalización celular (Dubois y col., 1998).

Por último, se ha demostrado la capacidad de la anexina A5 para regular procesos apoptóticos. Así, el fallo de miocardio se ha relacionado con un incremento en la apoptosis de los cardiomiocitos y en la expresión de anexina A5, así como de su translocación hacia el tejido intersticial (Hofstra y Heymans, 2007). Además, el empleo de anticuerpos frente a esta proteína, o su eliminación del medio en estudios *in vitro*, bloquea la apoptosis en cardiomiocitos, lo que sugiere que la anexina A5 tiene una actividad proapoptótica *per se* (Monceau y col., 2004). Como consecuencia de su actividad proapoptótica también se la ha relacionado con tumorigénesis, aunque su implicación en procesos cancerosos no está clara. Así, en carcinomas de endometrio y útero se ha observado una reducción en la expresión de anexina A5 (Karube y col., 1995), pero en cáncer colorrectal su expresión se ha asociado con estados avanzados del tumor y un mal pronóstico (Xue y col., 2009). En carcinomas orales se ha descrito que la anexina A5 incrementa la migración y la capacidad invasiva, lo que sugiere que también podría promover procesos metastásicos (Wehder y col., 2009).

2. OBJETIVOS

Los factores ambientales pueden ser determinantes para el desarrollo de la carcinogénesis colorectal. Entre ellos destacan los hábitos alimenticios, habiéndose comprobado que una *dieta rica en grasas* predispone frente a la formación de tumores de colon. Se ha sugerido que este hecho se debe a los altos niveles de ácidos biliares presentes en el lumen intestinal con el fin de emulsionar la grasa ingerida. La exposición continua a concentraciones anormalmente elevadas de ácidos biliares promueve alteraciones celulares, generando estrés oxidativo y daños en el DNA con el consiguiente efecto mutagénico. Este hecho puede conducir a la aparición de un grupo de células transformadas capaces de resistir los efectos apoptóticos de estos agentes y de dar origen a una masa tumoral.

Por otro lado se ha demostrado que una *dieta rica en fibra* ejerce un efecto protector frente al desarrollo de tumores colorrectales. Uno de los productos derivados de la fermentación anaerobia de la fibra en el colon es el butirato. Este es esencial en la homeostasis del epitelio colónico ya que regula procesos fundamentales como la proliferación, diferenciación y apoptosis. Estos efectos son consecuencia de su capacidad para inhibir la actividad de histona desacetilasa, alterando el perfil de expresión génica de la célula por acetilación de histonas y otras proteínas. De esta forma es importante el análisis de los mecanismos a través de los cuales este agente es capaz de regular la expresión de genes específicos que pueden ser determinantes en el proceso de transformación maligna.

Partiendo de estas premisas, se proponen los siguientes objetivos:

- Determinar los mecanismos a través de los cuales los ácidos biliares ejercen sus efectos citotóxicos en células de adenocarcinoma de colon. Analizar la respuesta a ácidos biliares en células que muestran resistencia a los efectos apoptóticos del butirato y también a otros tipos de estrés celular.
- Analizar si el efecto del butirato puede estar relacionado con cambios en el perfil de expresión génica y profundizar en los mecanismos a través de los cuales este agente es capaz de regular la transcripción de determinados genes, como los de la *anexina A1* y la *MMP-11*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

TAMPONES

Tabla 1.

Tampones para electroforesis y tinción de geles

	Composición
TAE	Tris-acetato 40 mM, pH 7,9, EDTA 1 mM.
Tampón de muestras SDS-PAGE	Tris 65 mM, pH 6,8, SDS al 3% (p/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol al 0,02% (p/v).
Tampón de desarrollo SDS-PAGE	Tris 25 mM, pH 8,4, glicocola al 0,14% (p/v), SDS al 0,1% (p/v).
TBE (0,5X)	Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM.
Azul de Coomassie (teñido)	Coomassie (Brilliant blue R-250) al 0,25% (p/v), metanol al 50% (v/v), ácido acético glacial al 10% (v/v).
Azul de Coomassie (desteñido)	Ácido acético glacial al 7,5% (v/v), metanol al 20% (v/v).

Otros tampones y disoluciones

	Composición
PBS	KH ₂ PO ₄ 1,4 mM, Na ₂ HPO ₄ 7 mM, pH 7,4, NaCl 130 mM, KCl 5 mM.
TBS	Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,15 M.
TE	Tris 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM.
Tampón de transferencia	Tris 48 mM, pH 9,5, glicocola 39 mM, SDS 0,0375% (p/v), metanol al 20% (v/v).
Tampón de <i>reprobing</i>	Tris 62,5 mM, pH 6,7, SDS 2% (p/v), β-mercaptoetanol 100 mM.
Disolución tripsina	PBS, tripsina (1:250) al 0,05% (p/v), EDTA al 0,02% (p/v).
NAR A	Hepes 10 mM, pH 7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM.
NAR C	Hepes 20 mM, pH 7,9, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM.
Tampón de lisis	Tris 10 mM, pH 8, NaCl 140 mM, TritonX-100 al 2% (v/v).
Reactivo de Bradford	Coomassie (Brilliant Blue G-250) al 0,01% (p/v) en etanol al 4,75% (v/v), ácido fosfórico al 8,5% (v/v).
SSC	Citrato sódico 300 mM, pH 7,0, NaCl 3 M.
Tampón de unión para EMSA	Tris 15 mM, pH 7,5, DTT 1,5 mM, EDTA 1,5 mM, MgCl ₂ 0,5 mM, glicerol al 5% (v/v).
Tampón de citometría de flujo	Hepes 10 mM, pH 8,5, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1,8 mM.

Tampones para ChIP

	Composición
Tampón de lisis celular	Hepes 5 mM, pH 8,0, KCl 85 mM, Nonidet-P40 0,5% (v/v).
Tampón de lisis nuclear	Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS 1% (p/v).
Tampón de dilución	Tris-HCl 16.7 mM, pH 8,0, NaCl 167 mM, EDTA 1,2 mM, SDS 0.01% (p/v), Triton X-100 1,1% (v/v).
Tampón de baja fuerza iónica	Hepes 50 mM, pH 8,0, NaCl 140 mM, Triton X-100 1% (v/v), desoxicolato sódico 0,1% (p/v), EDTA 1 mM.
Tampón de alta fuerza iónica	Hepes 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, Triton X-100 1% (v/v), desoxicolato sódico 0,1%, EDTA 1 mM.
Tampón LiCl	Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, LiCl 250 mM, Nonidet-P40 0,5% (v/v), desoxicolato sódico 0,1% (p/v), EDTA 1 mM.
Tampón de elución	Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS 1% (p/v).

Los trabajos recogidos en el apartado de Resultados contienen una descripción breve de cada uno de los métodos o técnicas empleadas a lo largo de la investigación realizada, por lo que aquí se exponen de forma más detallada sólo algunos de ellos.

3.1. TÉCNICAS GENERALES DE CULTIVO CELULAR

Todas las operaciones descritas a continuación se realizan en condiciones estériles, en cámara de flujo laminar vertical (Telstar), empleando material estéril. El material plástico procede de las casas Costar y Sarstedt; el material de vidrio se esteriliza en autoclave (Presoclave 75, Selecta) a 120°C durante 20 min. El medio de cultivo empleado es medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene 4,5 g/l de glucosa y 110 mg/l de piruvato (Sigma). El tampón PBS se prepara usando agua ultrapura (Milli-Q, Millipore) y se esteriliza en autoclave.

3.1.1. Cultivo celular y subcultivos

Las células se cultivan de forma rutinaria en medio DMEM suplementado con un 5% (v/v) de suero fetal bovino descomplementado (10% en el caso de las células Caco-2 y RD), 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina (medio completo), y se mantienen a 37°C en una atmósfera saturada de humedad compuesta por un 95% de aire y un 5% CO₂ (incubador de CO₂ de Nuaire, modelo DH Autoflow). El suero fetal bovino, la mezcla penicilina/estreptomycin

(20.000 U/ml y 20.000 mg/ml, respectivamente) y la disolución de glutamina (200 mM) son de Bio-Whittaker.

El medio de cultivo se reemplaza habitualmente cada dos o tres días. Cuando el número de células por superficie de crecimiento es lo suficientemente elevado, o cuando las células han alcanzado la confluencia, se procede a su subcultivo. Para ello, la capa celular se lava con PBS y las células se liberan de la superficie por tripsinización con una disolución de tripsina, preparada a partir de un *stock* comercial de tripsina-EDTA (Biological Industries). El cultivo celular se mantiene a 37°C controlándose el proceso de liberación de las células de la superficie de cultivo por observación al microscopio. Cuando las células se encuentran ya en suspensión, se añade medio de cultivo completo con el fin de inactivar la tripsina con el inhibidor de tripsina presente en el suero fetal bovino. La suspensión celular obtenida se centrifuga a 800 g (centrífuga MPW-223e) durante 10 min, y el sedimento se resuspende en un volumen apropiado de medio de cultivo completo. A continuación, las células se siembran en nuevos frascos de cultivo para su propagación, o se preparan, de forma adecuada, para los distintos tipos de ensayos.

3.1.2. Líneas celulares empleadas

En la Tabla 2 se recoge el origen de las líneas celulares empleadas así como una breve reseña de sus características.

3.1.3. Tratamientos

Ácidos biliares

Se preparan disoluciones *stock* a concentración 100 mM en DMSO de los distintos ácidos biliares (Sigma), conservándose a -20°C hasta el momento de su uso. En cada ensayo se añade el volumen adecuado de la disolución *stock* al medio DMEM completo hasta alcanzar la concentración de ácido biliar deseada, manteniendo una concentración final de DMSO no superior al 0,5% (v/v).

Inhibidores de HDAC

El butirato sódico (Sigma) se prepara a una concentración 40 mM disuelto en medio DMEM completo, se esteriliza por filtración a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Renner), y se conserva a 4°C hasta el momento de su utilización. En cada ensayo se añade el volumen adecuado de la disolución *stock* en medio DMEM completo hasta alcanzar la concentración final de butirato deseada. En el caso de la TSA

Tabla 2. Origen y características de las líneas celulares utilizadas

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS
BCS-TC2	Adenocarcinoma de colon humano	Poco diferenciadas No tumorigénicas (Turnay y col., 1990)
BCS-TC2.2	Obtenidas de tumores generados en ratones atímicos al coinyectar células BCS-TC2 con matrigel	Poco diferenciadas Tumorigénicas (Lopez-Conejo y col., 1996)
BCS-TC2.BR2	Selección a partir de células BCS-TC2 por resistencia permanente a butirato 2 mM	Poco diferenciadas Tumorigénicas (Lopez de Silanes y col., 2004)
HT29 (ATCC HTB38)	Adenocarcinoma de colon humano	Poco diferenciadas Tumorigénicas
Caco-2 (ATCC HTB37)	Adenocarcinoma de colon humano	Diferenciación espontánea Tumorigénicas
RD (ATCC CCL136)	Rabdomiosarcoma humano	Poco diferenciadas Tumorigénicas

(Sigma) se prepara una disolución *stock* 10 mM en DMSO, que se mantiene a -20°C hasta el momento de su utilización. En cada ensayo, se añade un volumen adecuado de la disolución *stock* al medio DMEM completo, manteniendo una concentración final de DMSO no superior al 0,5% (v/v). Tras la tripsinización, las células se siembran y se dejan crecer dos días hasta alcanzar la fase exponencial. En ese momento el medio de cultivo se reemplaza por los tratamientos correspondientes.

3.2. TÉCNICAS GENERALES PARA EL ANÁLISIS DE PROTEINAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS

3.2.1. Obtención de extractos proteicos

Obtención de extractos totales

La recogida de células se realiza por raspado de los cultivos tras el tratamiento. Las células se lavan con PBS y se centrifugan a 800 g durante 10 min. El sedimento

celular final se resuspende en el volumen adecuado de tampón de lisis, al que se adicionan inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina A 1 nM, leupeptina 1 µg/ml, Na₃VO₄ 1 nM, NaF 1nM, β-glicerofosfato 1 nM y ditiotreitól 1 mM). Esta suspensión celular se pasa 10 veces a través de una aguja de 0,5 x 16 mm y se centrifuga nuevamente durante 15 min a 13.000 g con el fin de eliminar el material celular no solubilizado. El sedimento se descarta y el sobrenadante se conserva a -20°C hasta su utilización. La concentración de proteína de los extractos celulares se cuantifica mediante el método descrito por Bradford (1976).

Obtención de extractos nucleares y citoplasmáticos

Tras raspar y recoger las células tal y como se ha indicado en el apartado anterior, éstas se resuspenden en tampón de lisis hipotónico NAR A con los inhibidores de proteasas y fosfatasas antes detallados. Las células se incuban en este tampón durante 10 min en hielo y a continuación se añade Nonidet P-40 a una concentración final del 0,1% (p/v). Tras 3 min a temperatura ambiente el extracto celular se agita en vórtex y la fracción citosólica se obtiene por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. El sedimento así obtenido contiene los núcleos que se resuspenden en tampón de extracción hipertónico NAR C con los inhibidores de proteasas y fosfatasas. La suspensión de núcleos se agita durante 1 h a 4°C y se obtiene el extracto nuclear tras centrifugar 5 min a 13.000 rpm. Los extractos nuclear y citoplasmático se conservan a -80°C. La concentración de proteína de los extractos celulares se cuantifica igualmente por el método de Bradford.

3.2.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección

La electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (PAGE-SDS). La polimerización de los geles, así como el desarrollo de la electroforesis, se llevan a cabo en un equipo Mini-Protean de Bio-Rad con geles de 0,75 o 1,5 mm de espesor, 7 cm de alto y 8 cm de ancho. Se emplean tanto sistemas de 10 como de 15 pocillos. Se utilizan un sistema discontinuo, de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La electroforesis se realiza a una intensidad de corriente constante (25 mA/gel) suministrada por una fuente Bio-Rad 1000/500. La detección de proteínas se lleva a cabo tras el desarrollo de la electroforesis por inmersión del gel durante 15 min en la disolución de tñido con azul de Coomassie

que, además, fija las proteínas al contener metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10%. El exceso de colorante se elimina por sucesivos lavados en la disolución de destañido.

Para el desarrollo del *Western blot* (transferencia e inmunodetección), la transferencia electroforética se realiza según el procedimiento descrito por Towbin y colaboradores (Towbin y col., 1979). Una vez finalizada la electroforesis, los geles, así como las membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL; Amersham) y las láminas de papel 3MM (Whatman), se equilibran durante 10 min en tampón de transferencia. La transferencia se lleva a cabo utilizando un equipo SV20-SDB (Sigma-Aldrich), aplicándose una intensidad de corriente constante de $0,8 \text{ mA/cm}^2$ de gel durante 1 h. Finalizada la transferencia, la membrana se satura por incubación a temperatura ambiente durante 1 h con PBS o TBS en presencia de leche deslipidizada al 5% (p/v). A continuación, se incuba durante 1 h a temperatura ambiente, o bien 18 h a 4°C , con el anticuerpo correspondiente diluido en PBS ó TBS en presencia de Tween-20 al 0,05% (v/v). Posteriormente, la membrana se lava exhaustivamente con ese mismo tampón. La incubación con el correspondiente segundo anticuerpo, marcado con peroxidasa, se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente a la dilución adecuada. Tras un lavado en condiciones idénticas a las del primer anticuerpo, el revelado se realiza utilizando un *kit* comercial de ECL (*Enhanced ChemiLuminescence*; Amersham). Para el revelado de los geles se han empleado dos métodos. En el primero de ellos, se expone una película fotográfica (Hyperfilm-ECL; Amersham) a la membrana, se revela posteriormente en una procesadora de sobremesa Curix 60 (Agfa) y finalmente se digitaliza utilizando un sistema de fotodocumentación de Uvitec. El segundo método es la detección directa de la quimioluminiscencia a través de un sistema de captura de imagen LAS-3000 (Fujifim). Todos los anticuerpos empleados en este trabajo se recogen en la Tabla 3.

En caso de que las membranas se reutilicen para llevar a cabo la inmunodetección de otras proteínas, dicha membrana se sumerge en tampón de *reprobing* durante 30 min a 50°C para eliminar los anticuerpos. Tras la retirada del tampón y posterior lavado exhaustivo de la membrana con TBS-Tween-20 al 0,05% (v/v), se procede nuevamente con el protocolo de detección con anticuerpos a partir de la saturación con leche deslipidizada.

3.2.3. Inmunoprecipitación de proteínas

Para la inmunoprecipitación de proteínas se han empleado dos métodos. Por un lado, los extractos (100-150 μg) se pre-clarifican por incubación con 25 μl de

Tabla 3. Relación de anticuerpos empleados en el trabajo.

ANTICUERPO	ANTÍGENO	TIPO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
EH17a	<i>Anexina A1</i> (38,6 kDa)	mAb	1/80	DSHB, Universidad de Iowa
Anti-anexina A5	<i>Anexina A5</i> (35,8 kDa)	Ab	1/1.000	Obtenido en nuestro laboratorio (Guzmán Aránguez y col., 2004)
Anti-MMP-11 (SL3-05)	<i>MMP-11</i> (45/55 kDa)	mAb	1/500	Calbiochem
Anti-MMP-2 (42-5D11)	<i>MMP-2</i> (72 kDa)	mAb	1/100	Calbiochem
Anti-p53 (Ab-6, clon DO-1)	<i>p53</i> (53 kDa)	mAb	1/1.000	Thermo Scientific
Anti-NF-YA	<i>NF-YA</i> (40 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-NFκB p50 (H-119)	<i>NFκB</i> (50 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-p21 (C-19)	<i>p21</i> (21 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Sp1 (PEP2)	<i>Sp1</i> (100 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-fosfo-Sp1	<i>Fosfo-Sp1</i> (T453)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Sp3 (D-20)	<i>Sp3</i> (60/100 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MAZ (A-17)	<i>MAZ</i> (60 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ZBP89 (S-15)	<i>ZBP89</i> (115 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Smad2/3 (E-20)	<i>Smad2/3</i> (55/60 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-fosfo-Smad2/3	<i>Fosfo-Smad2/3</i> (S423/425)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-fosfo-Smad3	<i>Fosfo-Smad3</i> (S423/425)	Ab	1/1000	Cell Signaling
Anti-acetil-Lys	<i>Proteínas con acetil-Lys</i>	mAb	1/1.000	Upstate
Anti-PARP	<i>PARP</i> (116 y 89 kDa)	mAb	1/500	LabGen
Anti-p38MAPK	<i>p38-MAPK</i> (43 kDa)	Ab	1/1.000	Cell Signaling
Anti-fosfo-p38MAPK	<i>Fosfo-p38</i> (T180/Y182)	Ab	1/1.000	Cell Signaling
Anti-p44/42MAPK	<i>p44/42</i> (44 y 42 kDa)	Ab	1/1.000	Cell Signaling
Anti-fosfo-p44/42MAPK	<i>Fosfo-p44/42</i> (T202/Y204)	Ab	1/1.000	Cell Signaling
Anti-JNK-MAPK	<i>JNK</i> (46 y 54 kDa)	Ab	1/1.000	Cell Signaling
Anti-fosfo-JNK-MAPK	<i>Fosfo-JNK</i> (T183/Y185)	Ab	1/1.000	Cell Signaling
Anti-Akt	<i>Akt</i> (60 kDa)	Ab	1/1.000	Cell Signaling
Anti-fosfo-Akt	<i>Fosfo-Akt</i> (S473)	Ab	1/1.000	Cell Signaling

mAb: anticuerpo monoclonal; Ab: anticuerpo policlonal.

Tabla 3 (cont.). Relación de anticuerpos empleados en el trabajo.

ANTICUERPO	ANTÍGENO	TIPO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-Bcl-2	<i>Bcl-2</i> (26 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Mcl-1	<i>Mcl-1</i> (35 y 40 kDa)	Ab	1/1000	Cell Signaling
Anti-Bcl-xL	<i>Bcl-xL</i> (30 kDa)	Ab	1/1000	Cell Signaling
Anti-Bax (N-20)	<i>Bax</i> (23 kDa)	Ab	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Bim	<i>Bim</i> (12, 15 y 23 kDa)	Ab	1/1000	Cell Signaling
Anti-Bid	<i>Bid</i> (15 y 22 kDa)	Ab	1/1000	Cell Signaling
Anti-Caspasa-3	<i>Caspasa-3</i> (21 kDa)	Ab	1/1000	Cell Signaling
Anti-Caspasa-9	<i>Caspasa-9</i> (21 kDa)	Ab	1/1000	Cell Signaling
Anti-lámina B1	<i>Lámina B1</i> (68 kDa)	mAb	1/500	MBL
Anti-vinculina (hVIN1)	<i>Vinculina</i> (116 kDa)	mAb	1/3.000	Sigma
Anti-DPP-IV-PE	<i>Dipeptidil peptidasa IV</i>	mAb	1/500	Conjugado con ficoeritrina, PharMingen/BD Biosciences
Anti-IgG de cabra-FITC	<i>IgG de Cabra</i>	Conejo	1/100	Conjugado con FITC, Jackson
Anti-IgG de conejo-HRP	<i>IgG de conejo</i>	Cabra	1/3.000	Conjugado con peroxidasa. Bio-Rad
Anti-IgG de ratón-HRP	<i>IgG de ratón</i>	Cabra	1/5.000	Conjugado con peroxidasa. Pierce
Anti-IgG de cabra-HRP	<i>IgG de cabra</i>	Conejo	1/20.000	Conjugado con peroxidasa. Jackson
Anti-IgG de ratón-HRP TRUE Blot	<i>IgG de ratón</i>	Cabra	1/1000	Conjugado con peroxidasa, eBioscience
Anti-IgG de cabra-HRP TRUE Blot	<i>IgG de cabra</i>	Conejo	1/1000	Conjugado con peroxidasa, eBioscience

mAb: anticuerpo monoclonal; Ab: anticuerpo policlonal.

Sepharose-4B durante 2 h a 4°C. Tras centrifugar, el sobrenadante se incubaba con el anticuerpo específico durante 20 h a 4°C. Se añaden 50 µl de una mezcla de esferas Proteína A-Sepharose 4B/Sepharose-4B (1:1) y nuevamente se incubaba otras 4 h a 4°C. Las esferas se lavan dos veces con PBS y el material retenido se eluye en tampón de aplicación de electroforesis. Las muestras se someten posteriormente a análisis por *Western blot*.

El otro método empleado se basa en el uso de partículas magnéticas. En este caso, se incuban 50 µl de Proteína G-Dynabeads (Invitrogen) con 2,5 µg del anticuerpo correspondiente durante 20 h a 4°C. Tras realizarse 3 lavados con PBS conteniendo albúmina de suero bovino (PBS/BSA 5 mg/ml) empleando un sistema Dynal MPC-S

(Invitrogen), se lleva a cabo la inmunoprecipitación añadiendo 100 µg de extracto sobre las *Dynabeads* e incubando 2,5 h a 4°C. El material inmunoprecipitado se lava tres veces con PBS/BSA y las proteínas se eluyen de las *Dynabeads* resuspendiendo en tampón de aplicación de electroforesis y calentando 5 min a 90°C.

3.2.4. RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction)

El RNA total se purifica empleando el *kit RNAqueus* (Ambion) según las especificaciones de la casa comercial. Cada muestra de RNA se somete a una transcripción inversa empleando el *kit* “High Capacity Reverse Transcription *Kit*” (Applied Biosystems). La expresión de mRNA se cuantifica usando un marcaje SYBR Green y empleando cebadores específicos para el gen que se desea estudiar. El análisis se lleva a cabo en un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). La cuantificación relativa se realiza siguiendo el método $\Delta\Delta C_T$, que emplea el rRNA 18S como gen endógeno de referencia.

3.2.5. Arrays de cDNA

Las células se recogen por tripsinización antes de alcanzar la confluencia, se lisan y el RNA total se aísla empleando el *kit ToTALLY RNA* (Ambion). Tras ello, las distintas preparaciones de RNA se someten a transcripción inversa en presencia de [α - ^{33}P]dCTP (ARC, 6000 Ci/mmol) y los productos marcados radioactivamente se emplean para hibridar *arrays* de cDNA (MGC arrays, 9600 genes). Los resultados de la hibridación se procesan de acuerdo a los valores del parámetro Z (Cheadle y col., 2003). De forma breve, este parámetro es el promedio del logaritmo decimal de la intensidad de cada punto (al menos se hace por triplicado) dividido por la desviación estándar de las intensidades de todos los puntos. Los cambios en la expresión génica entre las distintas líneas celulares o tratamientos se calculan por la diferencia entre los valores promedio de Z (*Z diff*), dividiéndose posteriormente por la desviación estándar de todos los valores obtenidos para *Z diff* para obtener el parámetro *Z ratio*. Estos valores se consideran significativos si su valor es $\geq 1,5$ o $\leq -1,5$, siendo considerados sólo aquellos valores que presentan $Z \geq 0$. Además, el cociente entre *Z diff* y su desviación estándar debe ser $\geq 2,5$, y $p \leq 0,01$.

3.3. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS

3.3.1. Ensayos de viabilidad celular

Para la valoración de la proliferación y la viabilidad celular se emplean dos aproximaciones metodológicas diferentes: la valoración con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio; Sigma) y la producción de ATP. Para el método con MTT se sigue el protocolo descrito por Mosmann (Mosmann, 1983). Se prepara una disolución *stock* de MTT a 5 mg/ml en PBS y se añade a las células a una concentración final de 1,25 mg/ml. Las muestras se incuban en oscuridad durante 3 h a 37°C en estufa de CO₂. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo de los pocillos y se añade la cantidad necesaria de HCl 0,04 N en isopropanol para lisar las células y disolver el precipitado. Finalmente, se registra la absorción a 570 nm en un lector de ELISA (Expert 96 de Asys/Hitech). Como blanco del ensayo se utiliza la absorbancia registrada en pocillos sobre los que se realiza el tratamiento anteriormente descrito, pero en ausencia de células.

La determinación de la viabilidad por niveles de ATP se lleva a cabo mediante un ensayo de bioluminiscencia (Cell-Titer Glo; Promega) basado en el sistema luciferasa-luciferina de luciérnaga. Las células se siembran en placas de 96 pocillos en presencia de medio completo. Dos días después de la siembra, el medio se reemplaza por medio fresco que contiene los diferentes agentes cuyo efecto se va a analizar. El ensayo se realiza siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial y la actividad luciferasa se mide en un luminómetro Lumat LB 9057 (Berthold).

3.3.2. Valoración de la actividad de fosfatasa alcalina

La actividad de fosfatasa alcalina se emplea como marcador de diferenciación celular. Para valorar dicha actividad se sigue el protocolo propuesto por Schroy y colaboradores (Schroy y col., 1994). Transcurrido el tiempo adecuado de tratamiento, se retira el medio de cultivo, se lava la monocapa con PBS y se lisan las células en el volumen adecuado de tampón de lisis. La suspensión celular se pasa 10 veces a través de una aguja de 0,5 x 16 mm y se conserva a 4°C hasta su valoración. La actividad de fosfatasa alcalina se determina mediante un *kit* (Spinreact) utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato. Una concentración fija de sustrato (1 ml de la solución comercial) se preincuba a 37°C durante 1 min en un espectrofotómetro termostatzado (DU 640, Beckman) antes de añadir 20 µl de la muestra y medirse la absorción a 405 nm. El

incremento de la absorbancia a 405 nm con el tiempo, debido a la formación de p-nitrofenol, es directamente proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina, tomándose la pendiente obtenida durante 3 min de incubación. Como blanco se considera la pendiente que genera 1 ml de la solución comercial en presencia de 20 µl del tampón de lisis. La actividad de fosfatasa alcalina se mide en mU por miligramo de proteína total, siendo la unidad de actividad la cantidad de fosfatasa alcalina necesaria para producir 1 mmol de p-nitrofenol por min a 37°C.

3.3.3. Citometría de flujo

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento adecuado, las células se tripsinizan, se centrifugan a 1.500 rpm y se lavan con PBS. El sedimento celular se resuspende en tampón de citometría, a una densidad de 1×10^6 células por mililitro de tampón. Alícuotas de 1×10^6 células se incuban durante 15 min a temperatura ambiente con la sonda correspondiente. Previamente a la realización de las medidas se añaden 100 µl de yoduro de propidio al 0,005% (p/v; Sigma) para discriminar las células necróticas. Como valor control se toma la fluorescencia intrínseca de las células en ausencia de sonda. La medida se realiza en un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson) del Centro de Microscopía y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid. Se emplean las siguientes sondas:

1. Anexina A5-FITC (isotiocianato de fluoresceína; marcador de apoptosis). La anexina A5 se aísla y marca con FITC en nuestro laboratorio (Turnay y col., 1995). Se añade entre 1 y 2 µg de anexina A5-FITC por cada 5×10^6 células.
2. DCFH (2',7'-diclorfluorescein-diacetato, Serva; marcador de estrés oxidativo). Se prepara una disolución concentrada (10 mM) en PBS, y se añade 1 µg por cada mililitro de suspensión celular.
3. Rodamina 123 (Sigma; marcador de potencial de membrana mitocondrial). Se prepara una disolución en PBS (10 µg/ml), y se añade 1 µg por cada mililitro de suspensión celular.

Para la detección por citometría de proteínas específicas mediante el empleo de anticuerpos, tras la tripsinización las células se lavan dos veces con PBS. 5×10^6 células se resuspenden en 500 µl de PBS en presencia de BSA al 0,1% (p/v) y azida al 0,02% (p/v). En caso de ser necesaria la permeabilización, las células se fijan con formaldehído al 3,7% (v/v) y se permeabilizan con Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS. La suspensión celular se incuba en presencia de la dilución apropiada de anticuerpo durante 1 h a 37°C

en oscuridad. Posteriormente, las células se lavan dos veces con PBS/BSA/azida y se incuban con la dilución apropiada del anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a 37°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavan dos veces con PBS/BSA/azida, se resuspenden en 300-500 μ l y se analizan.

3.3.4. Valoración de la actividad de lactato deshidrogenasa

La actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio extracelular se emplea como marcador de necrosis. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se recoge el medio y se centrifuga 10 min a 1.500 rpm. La actividad LDH se valora en la fracción libre de células empleando el *kit* LDH (Sigma). Una concentración fija de sustrato (piruvato) se atempera a 25°C durante 1 min en un espectrofotómetro termostatzado (DU-640; Beckman) antes de añadir 40 μ l de la muestra y medir la absorción a 340 nm. La disminución de la absorbancia a 340 nm con el tiempo, debido a la formación de NAD^+ , es directamente proporcional a la actividad LDH, tomándose la pendiente obtenida durante 3 min de incubación. Para obtener el blanco, la incubación se realiza con DMSO al 0,5% (v/v). La actividad se mide en mU por célula, lo que corresponde a la cantidad de LDH necesaria para producir 1 μ mol de NAD^+ por min a 25°C.

3.3.5. Fragmentación de DNA genómico

Una vez finalizados los tratamientos las células se recogen, se lavan con PBS y se resuspenden (10^7 células/ml) en un tampón Tris-borato 45 mM, pH 8,0, conteniendo Nonidet P-40 al 0,25% (v/v) y EDTA 10 mM. Se añade RNasa (Boehringer Mannheim) libre de DNasas a la suspensión celular a una concentración final del 0,1% (p/v) y se incuba 1 h a 50°C seguido de otra incubación de 1 h a 50°C en presencia de 1 mg/ml de proteinasa K. Finalmente, la temperatura se eleva hasta 70°C y se añade el tampón de carga [10 mM EDTA, pH 8,0, 0,25% (p/v) de azul de bromofenol, 40% (p/v) de sacarosa, y una concentración final del 1,5% (p/v) de agarosa de bajo punto de fusión]. Las muestras se cargan en un gel al 2% (p/v) de agarosa de alto punto de fusión y se lleva a cabo la electroforesis. El gel se tiñe con bromuro de etidio y se analiza por exposición a luz ultravioleta.

3.3.6. Determinación fluorimétrica de especies reactivas de oxígeno

Las células se siembran en placas de 96 pocillos a la densidad celular adecuada y se dejan crecer durante 48 h. Una vez realizados los tratamientos correspondientes, se

añaden al medio 10 µl de DCFH. Tras incubar 15 min a 37°C, se mide la fluorescencia del DCFH oxidado en un lector de placas Fluostar Optima (BMG Labtech) empleando un filtro de excitación de 485 nm y otro de emisión de 520 nm. Alternativamente puede estudiarse el efecto de diferentes inhibidores de enzimas productoras de especies reactivas de oxígeno por preincubación de las células durante 2 h, o con N-acetil cisteína 10 mM durante 1 h, previo al inicio de los tratamientos.

3.3.7. Actividad de caspasas

Para evaluar la actividad de caspasas las células se recogen por raspado y lavado en PBS y se lisan en tampón Tris 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, Nonidet P-40 al 1% (v/v), ortovanadato sódico 0,4 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 10 µg/ml, durante 30 min a 4°C. Posteriormente la muestra se centrifuga a 20.000 g durante 30 min, recogiendo el sobrenadante y valorándose la concentración de proteína. A 20 µg de extracto proteico se le añaden 5 volúmenes de tampón Hepes 25 mM, pH 7,5 que contiene CHAPS al 0,1% (v/v), sacarosa al 10% (p/v), DTT 10 mM y BSA 0,1 mg/ml. A continuación el extracto se incuba con los correspondientes sustratos fluorescentes a una concentración 10 mM: acetil-DEVD-7-amino-4-metilcumarina, acetil-IETD-7-amino-4-metilcumarina o acetil-LEHD-7-amino-4-metilcumarina (todos de Calbiochem), para medir la actividad de la caspasa-3, -8 o -9 respectivamente. Tras 1 h de incubación a 37°C, la reacción se detiene por adición de una mezcla de agua/acetonitrilo (75/25; v/v) y ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). La actividad caspasa es proporcional a la fluorescencia emitida por el sustrato una vez procesado por la caspasa. La fluorescencia se determina separando los distintos productos por HPLC en fase reversa (columna C18) y registrando la emisión de fluorescencia a 455 nm tras excitar a 338 nm.

3.3.8. Ensayo de activación de Bax

Estos ensayos se basan en la exposición del epítipo N-20, presente en el dominio N-terminal de la proteína, debido a los cambios conformacionales que sufre tras su activación. Para ello las células tratadas (2 placas de 10 cm de diámetro por muestra) se lisan en un tampón de lisis compuesto por Hepes 10 mM, pH 7,4, CHAPS al 1% (v/v), NaCl 150 mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 10 µg/ml, con el fin de preservar la conformación de Bax. Como control positivo de apoptosis, las células pueden tratarse con cisplatino 100 µM durante 24 h. Como control positivo de

inmunoprecipitación se emplea una muestra de células lisadas en un tampón que contiene Triton X-100 [Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (v/v), glicerol al 10% (v/v) e inhibidores de proteasas] y que expone completamente el epítipo N-20. Estos lisados se emplean tanto como extractos totales para análisis por *Western blot*, como para inmunoprecipitación. En este último caso, se incuba una alícuota de 50 µg de partículas proteína G-Sepharose durante 1 h a 4°C con 7,5 µl (0,2 mg/ml) del anticuerpo policlonal anti-Bax (N-20), se recuperan por centrifugación y se lavan dos veces con tampón de lisis. Los lisados se centrifugan a 13.000 g durante 5 min para eliminar los núcleos y desechos celulares. Tras determinación de la concentración de proteína y normalización de las muestras, los sobrenadantes se añaden a la suspensión de partículas y se incuban en rotación durante 2 h a 4°C. Los inmunoprecipitados se recogen por centrifugación y se lavan tres veces con 1 ml de tampón de lisis antes de resuspenderlos en tampón de carga para su posterior análisis por PAGE-SDS y *Western blot* con el anticuerpo anti-Bax N-20.

3.4. ANÁLISIS DE PROMOTORES

3.4.1. Ensayos de transfección y luciferasa

Para los ensayos de luciferasa, las células se siembran en placas de 24 pocillos y se cultivan hasta alcanzar la fase exponencial. En este punto las monocapas se lavan dos veces con medio de cultivo en ausencia de suero y se incuban con 1 µg de DNA durante 16 h a 37°C en presencia del reactivo de transfección Escort IV (Sigma). En la Figura 9 se indican las construcciones empleadas en este trabajo para los ensayos de luciferasa. A continuación se cambia el medio de cultivo, adicionando medio completo, y se deja recuperar durante 24 h a 37°C. A continuación se llevan a cabo los tratamientos correspondientes y, posteriormente, las células se recogen en el tampón de lisis suministrado en el *kit Luciferase Reporter Gene Assay* (Roche), se incuban a temperatura ambiente durante 15 min y se centrifugan durante 5 min a 5.000 rpm a 4°C. Finalmente, se mezclan 50 µl del sobrenadante con 100 µl de sustrato de la luciferasa por agitación en vórtex y se mide la actividad en un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold, Germany).

Para los experimentos de luciferasa dual se transfectan 500 ng del plásmido de estudio junto con 500 ng de plásmido pRL-TK (Promega) que dirige la expresión

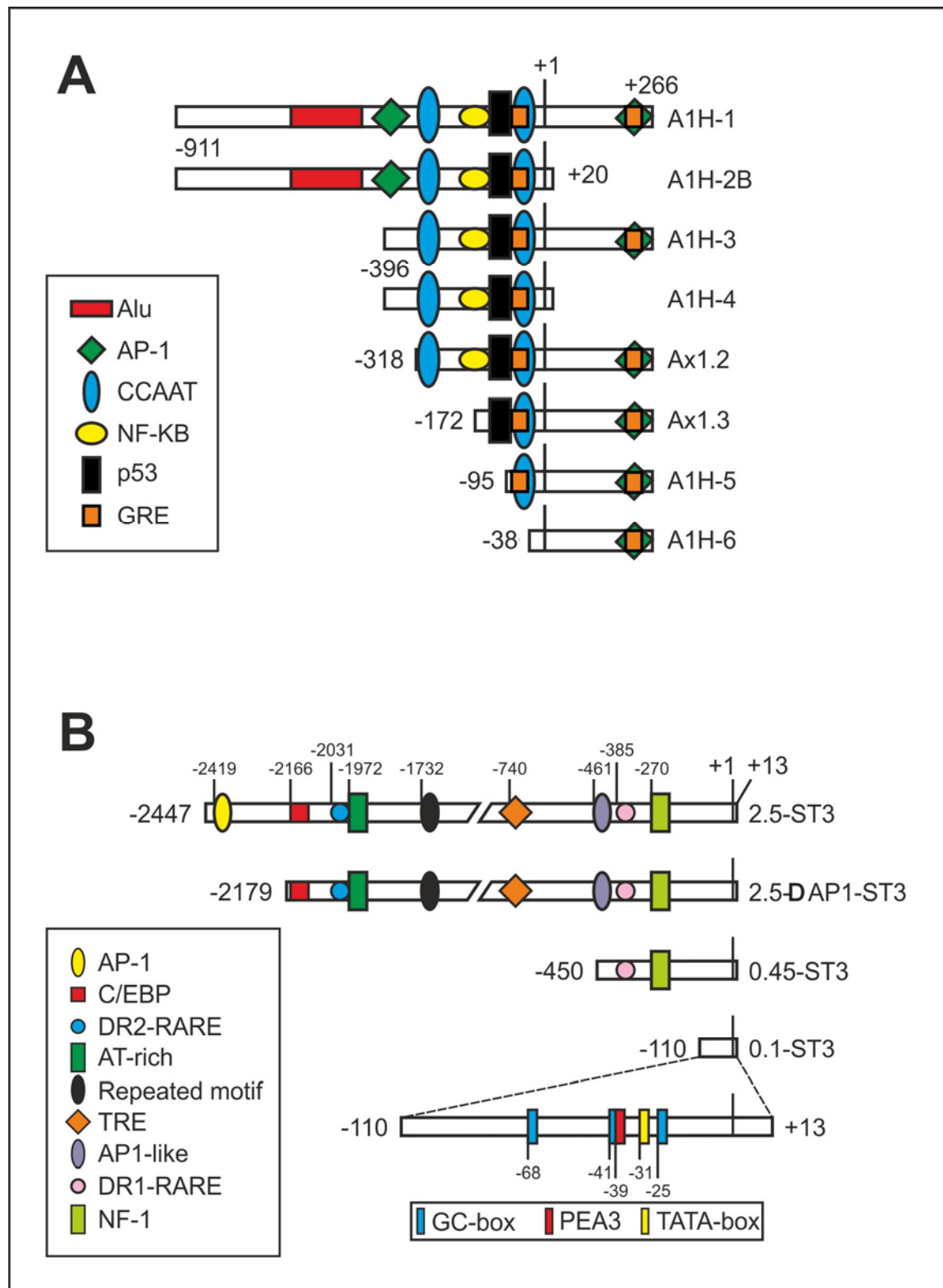


Figura 9. Esquema de las construcciones empleadas en los ensayos de luciferasa.

Construcciones conteniendo las diferentes regiones del promotor de la anexina A1 (A) y del de la MMP-11 (B), que se han analizado en cada caso. La figura muestra las posiciones de comienzo y final de la región clonada en cada plásmido respecto del sitio de inicio de la transcripción (+1). También se muestran de manera esquemática distintos sitios de unión para factores de transcripción.

constitutiva de la luciferasa de *Renilla*. La transfección y el tratamiento de las células se realizan de igual modo al descrito para los ensayos de luciferasa. Para medir la actividad de las luciferasas de luciérnaga y *Renilla* por separado se emplea el *kit Dual-luciferase Report System* (Promega). Brevemente, tras homogeneizar y centrifugar como en los ensayos de luciferasa, se añaden 20 µl de sobrenadante sobre 100 µl de reactivo para la luciferasa de luciérnaga y se mide la emisión en el luminómetro. A continuación, se añade un segundo reactivo que contiene un apagador de la emisión de luz por la luciferasa de luciérnaga y un sustrato específico para la luciferasa de *Renilla*, se agita en vórtex y se mide la emisión nuevamente. Los datos de luciferasa de luciérnaga se normalizan respecto a la actividad luciferasa de *Renilla* en cada muestra.

3.4.2. Ensayos de retardo en gel (EMSA; *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) y Superretardo (*Supershift*)

Los oligonucleótidos correspondientes a diferentes regiones de los promotores a analizar se mezclan en tampón SSC 0,3 veces concentrado a una concentración final de 25 ng/µl. Se incuban a 70°C durante 3 min y se dejan enfriar lentamente para conseguir su hibridación. Todos los oligonucleótidos empleados a lo largo del trabajo se especifican en la Tabla 4. Los oligonucleótidos de doble cadena se marcan por reacción con la polinucleótido quinasa del fago T4 en presencia de [γ - 32 P]ATP (ARC, 3000 Ci/mmol). Alternativamente se marcan oligonucleótidos de doble cadena correspondientes a los sitios de unión al DNA de los factores de transcripción que se desean analizar. La reacción se desarrolla durante 10 min y se detiene por adición de 1 µl de EDTA 0,5 M. A continuación, se diluye con 89 µl de tampón TE y se elimina el [γ - 32 P]ATP no incorporado empleando una columna de Sephadex G-25 (Amersham Biosciences). La sonda marcada se conserva a -20°C.

En la reacción de unión se incuban 5 µg de proteína de extracto nuclear con una cantidad adecuada de sonda marcada (según el tiempo transcurrido desde el marcaje) durante 30 min a temperatura ambiente en tampón de unión, en presencia de albúmina de suero bovino 20 µg/ml y 2 µg de poli(dI-dC) (Sigma). En las reacciones de competición se incorpora sonda no marcada a una concentración molar 100 veces mayor que la de la sonda en estudio. El volumen final de reacción es 20 µl. Para los experimentos de super-retardo se realiza una segunda incubación de 15 min a temperatura ambiente tras añadir el volumen adecuado de anticuerpo específico a la mezcla de reacción inicial.

Tabla 4. Relación de oligonucleótidos empleados en el trabajo.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
ChIP promotor <i>anexina A1</i>	
ChIP-p53f	5'-AATCACTGGTATTAGGATTGGGGCA-3'
ChIP-p53r	5'-AGTCGATACAGGTTTTTGTTCACCTTGT-3'
ChIP-CCAATf	5'-CATGTACTTCAAACAGAAGGCAGC-3'
ChIP-CCAATr	5'-ATGGAAGAACGTTTCTTGATTCTCTTT-3'
ChIP-p53+CCAATr	5'-TTTCCTTCGGTGTGGATCGTTGGTC-3'
ChIP promotor <i>MMP-11</i>	
ChIP-Sp1-f	5'-TGCTAGGAGAGTTCAGAACAAAAGG-3'
ChIP-Sp1-r	5'-GCGCTGCGGAGCCAG-3'
ChIP-p53up-f	5'-CCAACTCCTGACCTCGTGAT-3'
ChIP-p53up-r	5'-GCTGTGGGAGGTGTCTGAGT-3'
ChIP-p53down-f	5'-GAAGGATCCGTTGAGGCTCT-3'
ChIP-p53down-r	5'-AGTTTCTCCTCTGGGTGGTG-3'
qRT-PCR <i>MMP-11</i>	
Alfa-MMP-11f	5'-CGATGCTGCTGCTGCTGCTCCAG-3'
Beta-MMP-11f	5'-GGCTTCCTGACCACAGCCTCACCTTTG-3'
MMP-11r	5'-TGGCGTCACATCGCTCCATACCTTTAG-3'
EMSA promotor α-<i>MMP-11</i>	
0,1-ST3-a	5'-GGCCGCGGCTGCTAGGAGAGTTCAGAACAAAAGGCGGCGG GGGGCGGGGCCGAGGCGGG-3'
0,1-ST3-a-comp	5'-CCCGCCTCGGCCCCGCCCCCGCCGCTTTTGTCTGAACTC TCCTAGCAGCCGCGGCC-3'
0,1-ST3-b	5'-CCGAGGCGGGCCGGGGGTGGGGCGGAAGCTATAAGGGGCG GCGGCCCCGAGCGGC-3'
0,1-ST3-b-comp	5'-GCCGCTCCGGGCCCGCCCCCTTATAGCTTCCGCCCCACCCC CGGCCCCGCTCGG-3'
0,1-ST3-c	5'-ATAAGGGGCGGCGGCCCCGAGCGGCCAGCAAGCCCAGCAG CC-3'
0,1-ST3-c-comp	5'-GGCTGCTGGGCTTGCTGGGCCGCTCCGGGCCGCGCCCCCTTA T-3'
0,1-ST3-d	5'-CGGCGGGGGCGGGGCCGAGGCGGGCCGGGGGTGGGGCGG AAGCTATAAGGGGCGGCGGCCCG-3'
0,1-ST3-d-comp	5'-CGGGCCGCCGCCCCCTTATAGCTTCCGCCCCACCCCCGGCCCCG CCTCGGCCCCGCCCCCGCCG-3'

Tabla 4 (Cont.) Relación de oligonucleótidos empleados en el trabajo.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
EMSA promotor β-MMP-11	
0,06-ST3-a	5'-TCTTACTTCTCCTCGCCCTCTAGGAGTCTCTGTGGAGTCTTC-3'
0,06-ST3-a-comp	5'-GAAGACTCCACAGAGACTCCTAGAGGGCGAGGAGAAGTAAGA-3'
0,06-ST3-b	5'-GTGTAGGTTGTAAAAATTACTGCTGTCTTACTT-3'
0,06-ST3-b-comp	5'-AAGTAAGACAGCAGTAATTTTTACAACCTACAC-3'
0,06-ST3-c	5'-CTAGGAGTCTCTGTGGAGTCTTC-3'
0,06-ST3-c-comp	5'-GAAGACTCCACAGAGACTCCTAG-3'
Construcción <i>cNt-hA5</i>	
Primer A	5'-TCGTATAATGTGTGGAATTGTGAG-3'
Primer B	5'-TTCTGCATCAGCTCTGGCATC-3'
Primer C	5'-GCTGATGCAGAACTCTTCGG-3'
Primer D	5'-CTTAAGCTTAGTCATCTTCTCCACAGAG-3'

Los complejos DNA-proteína se resuelven por electroforesis en gel de poliacrilamida al 4% en TBE 0,5 veces concentrado, en condiciones no desnaturizantes. Tras polimerizar el gel se realiza un pre-desarrollo durante 30 min a 150 V en este tampón. Se cargan las muestras y se desarrolla la electroforesis durante 2,5 h a 180 V. A continuación se seca el gel y se expone a una película de autorradiografía a -80°C durante el tiempo que se estime adecuado según el marcaje de la sonda.

3.4.3. Inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP*)

Las células se siembran en placas de 10 cm de diámetro (10 placas/muestra) hasta alcanzar la fase exponencial, momento en el que se realizan los tratamientos correspondientes. A continuación se lleva a cabo el entrecruzamiento añadiendo sobre el medio de cultivo formaldehído a una concentración final del 1% (v/v), e incubando 3-4 min a temperatura ambiente en agitación. Tras ello, se descarta el medio y se detiene el entrecruzamiento añadiendo glicocola a una concentración final de 0,125 M e incubando durante 5 min a temperatura ambiente en agitación. Las células se lavan con PBS, se raspan y se recogen por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. Las células se resuspenden en 4-6 ml de buffer de lisis celular en presencia de inhibidores de

proteasas, se homogeiniza 3 veces en potter y se incuban en hielo 10-15 min. A continuación se centrifuga a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C para sedimentar los núcleos y estos se resuspenden en 1 ml de tampón de lisis nuclear.

A continuación se procede a la sonicación de la cromatina para obtener fragmentos de alrededor de 500 pares de bases. La cromatina sonicada se centrifuga 10 min a 12.000 rpm y 4°C las veces necesarias hasta que desaparezca el sedimento. El tamaño de los fragmentos se comprueba por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, mientras que la cantidad de cromatina de cada muestra se calcula por medida de absorbancia a 260 nm. Alícuotas de cada muestras se diluyen 1:100 en SDS al 1% y se establecen unas “unidades arbitrarias” según la fórmula: $A_{260} \times 100 = \text{u.a./ml}$. La cromatina sonicada se diluye diez veces en tampón de dilución.

Paralelamente se preparan 50 µl de Proteína G-*Dynabeads* por muestra. Se lavan tres veces con 1 ml de PBS/BSA (BSA 5 mg/ml). En cada lavado se centrifuga a 1 min a 3.000 rpm y 4°C, y se emplea un sistema magnético Dynal MPC-S (Invitrogen). Posteriormente las *Dynabeads* se resuspenden en 2 µg de anticuerpo por muestra y se incuban toda la noche a 4°C en rotación (los anticuerpos empleados van dirigidos frente a los factores de transcripción cuya posible unión al promotor se quiere comprobar). El mismo protocolo se lleva a cabo incubando *Dynabeads* sin anticuerpos (sólo con PBS/BSA), con el fin de tener un control negativo de inmunoprecipitación. A continuación se lavan las *Dynabeads* 4 veces con PBS/BSA, se resuspenden en 30 µl de PBS/BSA por muestra, y se lleva a cabo la inmunoprecipitación.

Para ello, a los 30 µl de *Dynabeads* (ya con el anticuerpo unido) se le añaden 3,5 u.a. de cromatina por muestra, igualándose los volúmenes finales de todas las muestras con tampón de dilución, y se incuban 1,5 h a 4°C en rotación. Se eliminan los sobrenadantes por decantación (sin centrifugación previa), y se guarda el sobrenadante de las *Dynabeads* incubadas sin anticuerpo como control positivo (*INPUT*). A continuación se realizan dos lavados con tampón de baja fuerza iónica, dos lavados con tampón de alta fuerza iónica, 2 lavados con tampón LiCl y 1 lavado con TE. Todos los lavados se realizan sin centrifugación, eliminando los sobrenadantes por decantación y resuspendiendo las *Dynabeads* en 1 ml de cada uno de los tampones. Tras el lavado final con TE, las *Dynabeads* se centrifugan 1 min a 3.000 rpm y el sobrenadante se elimina con pipeta. Se resuspende cada muestra con vórtex en 30 µl de tampón de elución y se incuba 10 min a 65°C. Se centrifuga 1 min a 3.000 rpm y se recoge el sobrenadante en un tubo eppendorf. Las *Dynabeads* se vuelven a resuspender en 30 µl

de tampón de elución y se vuelven a incubar 10 min a 65°C. Tras centrifugación, los 30 µl de sobrenadante se añaden al tubo eppendorf con los anteriores. A estos 60 µl se les añaden 140 µl de tampón de elución y se incuban toda la noche a 65°C (también se incuban los *INPUT*, a los que se añaden 10 µl de RNasa A). A continuación se añaden 2 µl de proteinasa K a las muestras y 4 µl a los *INPUT*, y se incuba 1,5 h a 37°C. Finalmente se purifica el DNA mediante un *kit* (PCR Purification *Kit*; Quiagen) y se realiza la PCR con los cebadores apropiados. Los fragmentos de PCR se resuelven por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, se tiñen con bromuro de etidio y se analizan en un sistema de fotodocumentación Gel Doc XR (Bio-Rad).

3.5. EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ANEXINA A5

En este apartado sólo se describe en detalle la metodología empleada en los experimentos con los que se ha estado más directamente implicado.

3.5.1. Expresión y purificación

La expresión y purificación de la anexina A5 humana (hA5) y de pollo (cA5), así como de la proteína de pollo truncada en el dominio N-terminal (dnt-cA5), se realizó según el protocolo previamente descrito (Turnay y col., 1995), tras transformación de la cepa de *E. coli* JA221 con las construcciones pHA5.E, pACII.E y pdNtACII.E, respectivamente. Las proteínas recombinantes se aíslan por interacción reversible con vesículas fosfolipídicas enriquecidas en PS y una cromatografía final en DEAE-celulosa.

Para la obtención de la proteína quimérica cNt-hA5, formada por el núcleo proteico de la anexina A5 humana y el dominio N-terminal de la anexina A5 de pollo (23 primeros residuos), se llevó a cabo la construcción de un vector de expresión mediante la técnica de extensión por solapamiento a través de tres reacciones de PCR, como se ilustra en la Figura 10. Las construcciones pHA5.E y pACII.E se utilizan como moldes de cDNA iniciales de la anexina A5 humana y la de pollo, respectivamente. El fragmento final amplificado se clonó inicialmente en el plásmido pCR2.1 (*Kit TC Cloning*, Clontech) y, posteriormente, en el vector de expresión pTrc99A (Pharmacia) entre los sitios de restricción *NcoI/HindIII*. La construcción se secuenció en ambas direcciones para verificar la ausencia de artefactos. El plásmido de la anexina A5

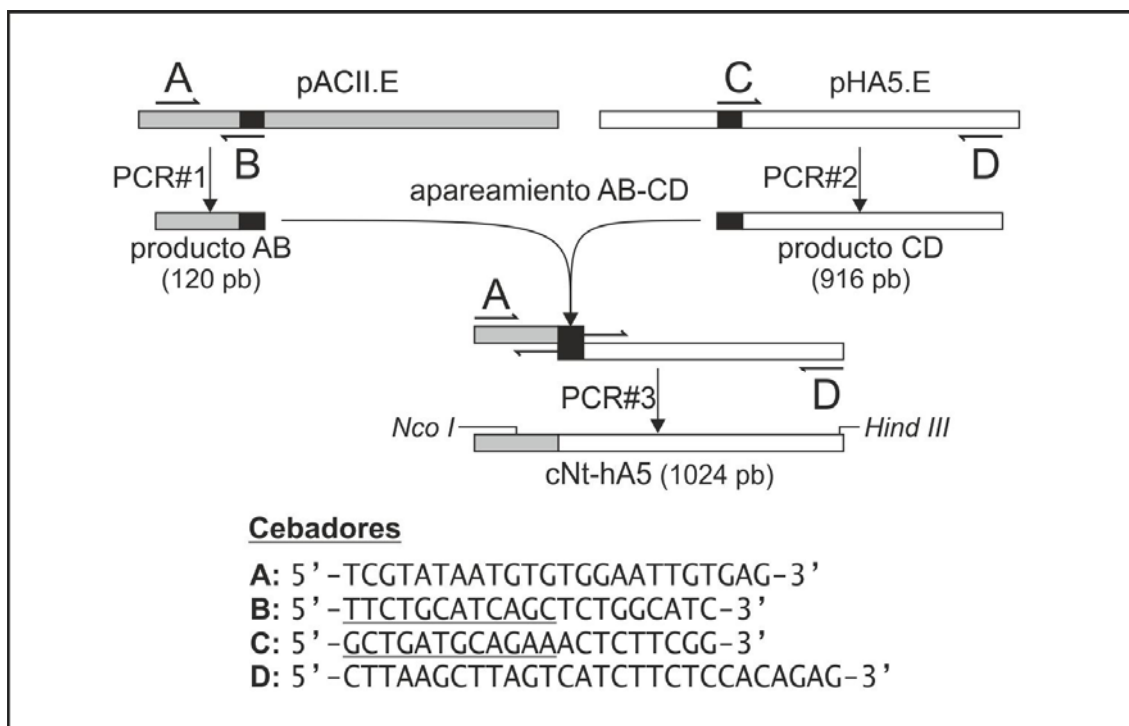


Figura 10. Construcción de la quimera cNt-hA5.

Esquema de la técnica de extensión por solapamiento diseñada para la obtención de la quimera cNt-hA5. Se muestran los cuatro cebadores (A, B, C y D) empleados en las tres reacciones de PCR, subrayándose las secuencias solapantes entre los cebadores B y C. Se indica el tamaño en pares de bases de cada uno de los productos obtenidos a lo largo del proceso.

quimérica, denominado pcNt-hA5.E, se expresó en la cepa JA221 de *E. coli* y se purificó siguiendo el mismo protocolo que con el resto de anexinas recombinantes.

3.5.2. Caracterización estructural y funcional

Espectros de dicroísmo circular

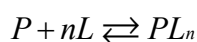
Las medidas de dicroísmo circular de las proteínas se llevan a cabo en un dicrógrafo Jasco modelo J-715 que incorpora un arco de xenon de 150 W. Se emplean cubetas termostatzadas de 0,05-0,1 cm de paso óptico para registrar el espectro en la región del ultravioleta lejano ($\lambda < 250$ nm), convirtiéndose los datos a elipticidad molar por residuo de aminoácido. Las medidas se realizan a 20°C con una velocidad de barrido constante de 50 nm/min, un ancho de banda de 2 nm y una resolución de 0,2 nm, realizándose un mínimo de seis barridos por espectro y restándose la contribución del tampón. Las predicciones de estructura secundaria se obtienen empleando el algoritmo CCA (*Convex Constraint Analysis*) descrito por Perczel y col. (Perczel y col., 1991). Las curvas de desnaturalización térmica se obtienen entre 20 y 80°C. Para ello se

fija la longitud de onda a 208 nm (punto isodicroico de la lámina β y la estructura aperiódica), aumentando la temperatura a 60°C/h utilizando un baño termostático Neslab RTE-111 conectado directamente por el software del dicrógrafo.

Espectros de fluorescencia

Para la medida de los espectros de fluorescencia se emplea un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C equipado con un arco de xenon de 450 W. Las disoluciones de proteína se analizan en cubetas de 0,4 cm de paso óptico de excitación y 1,0 cm de emisión, empleando anchuras de rendija de 4 cm para ambos haces de luz. Los espectros se obtienen a 20°C, excitando a 295 nm y registrando la emisión de fluorescencia entre 300 y 410 nm (fluorescencia de los residuos de Trp). En caso necesario se emplean polarizadores de calcita Glan-Thompson que permiten evitar los efectos de dispersión de luz. En todos los casos se resta la emisión de fluorescencia de la disolución equivalente en ausencia de proteína.

La interacción de las proteínas recombinantes con vesículas de PS (50 nm de diámetro, obtenidas por extrusión), se determina mediante análisis del desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia de dichas proteínas en presencia de CaCl_2 200 μM y a relaciones molares lípido/proteína concretas. Los datos de unión proteína (P)-lípido (L) se analizan considerando el siguiente equilibrio:



Donde n es el número de moléculas de fosfolípido implicadas en la interacción. Así, la constante de disociación aparente (K_d) se puede determinar a partir de la ecuación:

$$\frac{[L]_t}{[P]_u} = \frac{K_d n}{[P]_l} + n$$

donde $[P]_u$ es la concentración de proteína unida, $[P]_l$ la libre, y $[L]_t$ la concentración total de PS.

Caracterización funcional

La metodología adicional empleada para la caracterización de la unión de las proteínas a vesículas fosfolipídicas y su capacidad de agregación de las mismas se describe en detalle en la publicación adjunta (Turnay y col., 2009).

4. RESULTADOS

4.1. APOPTOSIS INDUCIDA POR ÁCIDOS BILIARES

4.1.1. Mecanismos de apoptosis inducidos por DCA y CDCA

Los ácidos biliares, que constituyen uno de los principales componentes del lumen intestinal, se encuentran a concentraciones anormalmente elevadas si la dieta es rica en grasas o debido a diferentes patologías. La exposición prolongada a altas concentraciones de ácidos biliares genera efectos citotóxicos sobre las células del epitelio colónico, lo que a su vez se ha relacionado con el desarrollo de tumores. La mayor parte de los datos que se conocen acerca de la inducción de muerte celular por ácidos biliares corresponden a estudios en hepatocitos, pero se desconocen los mecanismos a través de los cuales estos compuestos promueven la apoptosis en células del epitelio colónico. En consecuencia, se ha abordado el análisis en profundidad de los efectos ejercidos por el DCA y el CDCA en células de adenocarcinoma de colon humano

Artículo 1: Juan I. Barrasa, Nieves Olmo, Pablo Pérez-Ramos, Angélica Santiago-Gómez, Emilio Lecona, Javier Turnay y M^a Antonia Lizarbe. “Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells.”

Apoptosis **16**:1054-1067 (2011).

Se ha analizado la citotoxicidad a tiempos cortos (2 h) de los ácidos biliares DCA y CDCA en células BCS-TC2 de adenocarcinoma de colon humano, observándose un descenso en la viabilidad celular dependiente de concentración, y un efecto más acusado en el caso del CDCA. Se ha comprobado que esta muerte celular inducida por ácidos biliares no era consecuencia de una diferenciación terminal, sino que las células adquirirían características propias de procesos apoptóticos, como desadhesión celular, fragmentación del DNA cromosómico, pérdida en la asimetría de membrana y degradación de dianas típicas como las proteínas PARP [*Poly (ADP-ribose) polymerase*] o lámina B1. El análisis de la actividad de caspasas ha puesto de manifiesto que los ácidos biliares no activan la ruta extrínseca en estas células, pero sí la ruta mitocondrial intrínseca dependiente del apoptosoma. Este hecho se ha corroborado

al observarse un descenso en el potencial de membrana mitocondrial dependiente del tiempo en células tratadas con CDCA. En este sentido, también se ha observado que los ácidos biliares, principalmente el CDCA y en menor medida el DCA, facilitan la activación de la proteína proapoptótica Bax al promover la degradación por caspasas de Bcl-2. Bcl-2 es una proteína antiapoptótica que mantiene secuestrado a Bax impidiendo su oligomerización. La degradación de Bcl-2 inducida por ácidos biliares facilita la formación de poros dependientes de Bax en la membrana mitocondrial, incrementándose así la señal apoptótica. Finalmente, se comprobó que estos efectos apoptóticos se desencadenan a través de un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno por activación de enzimas asociadas a membrana [PLA₂ y NAD(P)H oxidasas]. Este estrés oxidativo constituiría el evento inicial en la apoptosis inducida por ácidos biliares, promoviendo la transición de permeabilidad mitocondrial y la liberación de factores proapoptóticos al citoplasma. La posterior activación del apoptosoma y de las caspasas asociadas facilita la activación de Bax por degradación de Bcl-2, de modo que la señal apoptótica se amplifica por formación de poros adicionales dependientes de Bax en la mitocondria.

Aportación personal

La aportación a este trabajo abarca el análisis de los niveles de diferentes dianas proteicas características de apoptosis, así como los ensayos de activación de Bax en presencia y ausencia de un inhibidor de caspasas y el estudio de los niveles asociados de Bax y Bcl-2. También se han realizado los ensayos de detección de especies reactivas de oxígeno y de viabilidad, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores específicos de diferentes enzimas asociadas a membrana.

Apoptosis (2011) 16:1054–1067
DOI 10.1007/s10495-011-0633-x

ORIGINAL PAPER

Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells

Juan Ignacio Barrasa · Nieves Olmo ·
Pablo Pérez-Ramos · Angélica Santiago-Gómez ·
Emilio Lecona · Javier Turnay · M. Antonia Lizarbe

Published online: 23 July 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract The continuous exposure of the colonic epithelium to high concentrations of bile acids may exert cytotoxic effects and has been related to pathogenesis of colon cancer. A better knowledge of the mechanisms by which bile acids induce toxicity is still required and may be useful for the development of new therapeutic strategies. We have studied the effect of deoxycholic acid (DCA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) treatments in BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells. Both bile acids promote cell death, being this effect higher for CDCA. Apoptosis is detected after 30 min–2 h of treatment, as observed by cell detachment, loss of membrane asymmetry, internucleosomal DNA degradation, appearance of mitochondrial transition permeability (MPT), and caspase and Bax activation. At longer treatment times, apoptosis is followed in vitro by secondary necrosis due to impaired mitochondrial activity and ATP depletion. Bile acid-induced apoptosis is a result of oxidative stress with increased ROS generation mainly by activation of plasma membrane enzymes, such as NAD(P)H oxidases and, to a lower extent, PLA₂. These effects lead to a loss of mitochondrial potential and release of pro-apoptotic factors to the cytosol, which is confirmed by activation of caspase-9 and -3, but not caspase-8. This initial apoptotic steps promote cleavage of Bcl-2, allowing Bax activation and formation of additional pores in the mitochondrial membrane that amplify the apoptotic signal.

Keywords Apoptosis · Bile acids · Caspases · Colon adenocarcinoma · Reactive oxygen species

Abbreviations

CA	Cholic acid (3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholanoic acid)
CDCA	Chenodeoxycholic acid (3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholanoic acid)
DCA	Deoxycholic acid (3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholanoic acid)
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
DPI	Diphenyleneiodonium
LCA	Lithocholic acid (3 α -hydroxy-5 β -cholanoic acid)
LDH	Lactate dehydrogenase
MPT	Mitochondrial transition permeability
NAC	N-acetyl-cysteine
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
ROS	Reactive oxygen species
UDCA	Ursodeoxycholic acid (3 α ,7 β -dihydroxy-5 β -cholanoic acid)

Introduction

Bile acids are natural detergents that allow lipids to be digested in the intestinal lumen and play a major role in the maintenance of bile flow and intestinal homeostasis. The primary bile acids, cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA), are synthesized and conjugated with glycine and taurine in the liver, stored in the gall bladder and then released into the intestinal tract [1]. Most of these bile acids are reabsorbed at the distal small intestine via the

J. I. Barrasa · N. Olmo · P. Pérez-Ramos ·
A. Santiago-Gómez · E. Lecona · J. Turnay ·
M. Antonia Lizarbe (✉)
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense,
28040 Madrid, Spain
e-mail: lizarbe@bbm1.ucm.es

enterohepatic circulation, but a small fraction of them entry the colon where they are metabolized to secondary or tertiary bile acids by the anaerobic bacterial flora [2]. For example, 7-dehydroxylation of CA or epimerization of the hydroxyl group in position 7 of CDCA yield deoxycholic acid (DCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA), respectively. Under physiological conditions, concentrations of bile acids in the final tract of the colon may be low compared to those in the gallbladder (~ 300 mM) or the small intestine (~ 10 mM), but concentrations as high as 1 mM in cecum or in fecal waters can be reached in humans with a high fat diet or under pathological circumstances; DCA concentration under these conditions can reach values around 700–800 μ M [3–5].

The effect of bile acids has been extensively studied in hepatocytes and biliary epithelium. A diet rich in fat increases the levels of bile acids in the colonic lumen, which have been related with the development of colorectal cancer [6]. Two different mechanisms have been reported for the cytotoxic effects of bile acids. High concentrations induce necrosis due to their detergent-like properties, which cause membrane damage [7], and generation of reactive oxygen species (ROS) [6]. Lower concentrations of hydrophobic bile acids, such as CDCA and DCA, also enhance the generation of ROS, leading to a state of cell oxidative stress that can trigger apoptosis by the disruption of the mitochondrial membrane potential and activation of the mitochondrial permeability transition (MPT) [8, 9]. This mitochondrial dysfunction promotes the release into the cytosol of different compounds that reside in the mitochondrial intermembrane space, such as cytochrome *c*, apoptosis-inducing factor (AIF) and SMAC/Diablo, which are key signals triggering apoptosis [10]. Alternatively, bile acids are able to induce apoptosis through the extrinsic pathway, mainly through CD95/Fas [11] and TRAIL-R2 [12]. These death receptors activate caspase-8 which can activate effector caspases (caspase-3, -6 and -7), and/or cleave Bid triggering the mitochondrial intrinsic pathway. It has also been described that bile acids can induce hepatocyte apoptosis through endoplasmic reticulum stress [13]. Moreover, the oxidative DNA damage induced by bile acids promotes a tumorigenic phenotype through an aberrant expression of oncogenes and tumor suppressor genes [14].

Although the majority of studies have been carried out in hepatocytes, the increasing evidence of the tumor promoting effect of exposure to bile acids (e.g. DCA) on intestinal epithelial cells reinforces the importance of analyzing the effect of these molecules on different types of gastrointestinal cells. On the other hand, other bile acids, as UDCA, have been shown to be cytoprotective against other more hydrophobic bile acids, such as DCA, in colonic epithelial cells [15]. We have previously described

that unconjugated bile acids DCA, CDCA, UDCA and lithocholic acid (LCA) affect cell viability of BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells in a time- and dose-dependent manner, whereas CA has almost no effect [16]. Preliminary studies pointed out that cell death was probably induced via apoptosis as caspase-3 activation and apoptotic bodies could be detected in DCA- and CDCA-treated cultures [16, 17]. In this study we have further dissected the pathways for the induction of apoptosis by DCA and CDCA on non-tumorigenic BCS-TC2 cells [18] through the analysis of cell detachment, caspase-pathway activation, changes in mitochondrial membrane potential, and ROS generation. Our results show that high concentrations of DCA and CDCA promote several cell alterations, both in attachment capacity and mitochondrial functionality, being these effects more marked for the primary bile acid CDCA. Together with the increased ROS generation detected after bile acid-treatments, our findings support an oxidative stress mechanism for apoptosis induced by DCA and CDCA in BCS-TC2 cells.

Materials and methods

Chemicals, materials and antibodies

Bile acids (CA, CDCA, DCA and UDCA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), sodium butyrate, dimethyl sulfoxide (DMSO), *N*-acetyl-cysteine (NAC), ovalbumin, cisplatin, *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-methyl) fluoromethylketone (Z-VAD-FMK), rhodamine-123, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), propidium iodide and protein G-Sepharose beads were from Sigma (Alcobendas, Spain). The NAD(P)H oxidase activity inhibitors apocynin and diphenyleneiodonium (DPI) as well as the phospholipase A₂ (PLA₂) inhibitor quinacrine were from Merck (Darmstadt, Germany). Protease inhibitors aprotinin, leupeptin and pepstatin were from Roche (Sant Cugat del Vallès, Spain). DNase-free RNase A and proteinase K were from Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain). Caspase specific substrates acetyl-DEVD-, acetyl-IETD-, and acetyl-LEHD-7-amido-4-methylcoumarin were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). The primary mouse monoclonal antibodies against human p53 (Ab-6, clone DO-1; Thermo Scientific, Alcobendas, Spain), lamin B1 (MBL, Woburn, MA), poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) (Labgen, Labclinics, Barcelona, Spain), p21 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA), vinculin (hVIN1, Sigma), Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and the rabbit polyclonal antibodies against activated Bax (N-20; Santa Cruz Biotechnology), caspase-3 and caspase-9 (both from Cell Signaling, Danvers, MA, USA), as well as the secondary

peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad, Alcobendas, Spain) and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Pierce, Bonn, Germany) were used in Western blot. Recombinant annexin A5 was obtained in our laboratory and FITC-labeling was carried out as previously described [19]. Fetal calf serum and cell culture medium supplements were obtained from Bio-Whittaker (Verviers, Belgium). Cell culture plastic-ware was from Corning (Lowell, MA, USA). All other chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma or Merck.

Cell culture

The establishment and characterization of the non-tumorigenic and poorly differentiated human colon adenocarcinoma cell line BCS-TC2 has been previously described [18]. These cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), containing 4.5 g/l glucose, and supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum, penicillin (50 IU/ml), streptomycin (50 µg/ml) and glutamine (300 µg/ml). Routinely, cells were cultured at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. The culture medium was replaced every 3 days and cells were routinely weekly subcultured by trypsinization [0.05% (w/v) trypsin, 0.02% (w/v) EDTA in Ca²⁺- and Mg²⁺-free phosphate-buffered saline (PBS: 50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 0.15 M NaCl)]. After centrifugation, cells were allowed to recover in supplemented medium, washed with PBS and resuspended in the appropriate medium at the required cell density for each assay.

Bile acid treatments

Stock solutions of bile acids were prepared at 100 mM in DMSO and maintained at −20°C. Aliquots of these solutions were added to the supplemented culture medium in order to obtain the appropriate final concentration of the bile acid and at final DMSO concentration of 0.5% (v/v). Samples containing the same volume of DMSO added into the culture medium were used as controls. In any case, no significant cytotoxic effects were observed between controls with or without 0.5% DMSO. Cell treatments were always carried out on subconfluent cultures unless otherwise stated. Cells were seeded at $3\text{--}6 \times 10^4$ cells/cm² in supplemented culture medium and were allowed to attach and grow for 2 days before the addition of fresh culture medium containing the corresponding bile acid. Cells were then incubated under these conditions during the required periods of time. After the addition of the bile acids, morphological changes were monitored by phase-contrast microscopy. Analyses were carried out either on total

cultures, or after separation of detached/floating cells by centrifugation of the culture medium, and harvesting of attached cells (monolayer) by trypsinization.

Cell viability studies

Cell viability was determined using an adenosine triphosphate (ATP)-bioluminescence assay (CellTiter-Glo, Promega, L'Hospitalet de Llobregat, Spain) which measures the number of viable cells using the firefly luciferase–luciferin system. In brief, BCS-TC2 cells were seeded into 96-well plates at $1\text{--}2 \times 10^4$ cells/well in supplemented medium and were cultured under standard conditions for 2 days. Afterwards, medium was removed and changed for fresh one containing the corresponding bile acid and cell viability was analyzed after the indicated incubation time. The assay was performed following manufacturer's recommendations. Luciferase activity was measured in a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold, Germany).

Cell detachment, differentiation and necrosis

Cell detachment was determined by collection of non-attached cells by centrifugation of the culture medium after the different treatments, resuspension in PBS and analysis in a flow cytometer. Detachment is expressed in arbitrary units that represent the inverse of the time required to count 5,000 cells in the cytometer. Alkaline phosphatase (ALP) activity was measured in cell extracts obtained as previously described [20] using a commercially available kit (Spinreact, Barcelona, Spain). One unit of enzyme activity is defined as 1 µmol of substrate hydrolyzed per minute at 37°C. Butyrate, an inductor of differentiation of BCS-TC2 cells [21], was prepared in standard culture medium and sterilized by filtration. For ALP determination, treatments were performed 2 days after seeding $1\text{--}2 \times 10^4$ cells/cm² in 6 well plates, and cells were afterwards maintained in the presence of DCA, CDCA, or butyrate at the indicated concentrations for additional 4 days. Leakage of lactate dehydrogenase (LDH) was measured as an index of lethal membrane injury or necrosis. Briefly, release of LDH into the culture medium was evaluated after incubation of BCS-TC2 cells with 500 µM bile acids for times ranging from 2–48 h. LDH activity was determined following the oxidation of NADH at 340 nm and 37°C using the TOX7 kit from Sigma in a Beckman DU640 spectrophotometer. Normalization was achieved by measuring LDH activity in parallel wells lysed by addition of Triton X-100 at a final concentration of 1% (v/v), which were considered as 100% in each case.

Detection of genomic DNA fragmentation by electrophoresis

DNA laddering was assessed as described previously by agarose gel electrophoresis of genomic DNA in both attached and floating cells [21]. Briefly, after washing with PBS, cells were resuspended (10^7 cells/ml) in 45 mM Tris-borate, pH 8.0, containing 0.25% Nonidet P-40 and 10 mM EDTA. DNase-free RNase A was added at a final concentration of 0.1% (w/v) and the cell suspension was incubated for 1 h at 50°C followed by a further incubation for 1 h at 50°C in the presence of 1 mg/ml of proteinase K. Finally, temperature was raised up to 70°C and loading buffer [10 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% (w/v) bromophenol blue, 40% (w/v) sucrose, containing 1% (w/v) final concentration of low-melting agarose] was added. Samples were loaded onto 2% (w/v) high-melting agarose gel, and electrophoresis was performed. The gel was stained with ethidium bromide and observed under UV light.

Flow cytometry analysis

For flow cytometry, 10^6 cells resuspended in 10 mM Hepes, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ and 1.8 mM $CaCl_2$, were incubated for 15 min at room temperature in the presence of 2 µg/ml annexin A5-FITC [19] or 1 µg/ml rhodamine-123 in order to analyze reversion of membrane asymmetry and changes in mitochondrial membrane potential, respectively. Debris and clumps were excluded by monitoring forward and side scattering parameters. To discern necrotic cells, 0.005% (w/v) propidium iodide was added. Analyses were performed in a FACScan cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA), as previously reported.

Fluorimetric determination of reactive oxygen species

Cells were seeded in 96-well plates at 2×10^4 cells/well, grown for 2 days under standard culture conditions, and then a 1 h preincubation without or with 10 mM NAC was carried out. Cells were then treated with 100, 250 or 500 µM DCA or CDCA for different periods of time without removing the culture medium, followed by addition of 10 µM DCFH-DA in order to quantify ROS generation. After 15 min incubation at 37°C, oxidized DCFH fluorescence was measured in a Fluostar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Germany) with an excitation filter of 485 nm and emission of 520 nm.

In order to check the effect of NAD(P)H oxidases or PLA_2 inhibitors on ROS production, a 2 h preincubation with these inhibitors was carried out; afterwards, the medium was removed and 500 µM DCA or CDCA was

added and cells were incubated for 30 min before measuring ROS as described above. The concentration of inhibitors was selected considering the maximum inhibitory activity that did not induce cytotoxicity in our system.

Caspase activity assays

Caspase activity was determined in cell lysates using either acetyl-DEVD-, acetyl-IETD-, or acetyl-LEHD-7-amino-4-methyl-coumarin as substrates to detect caspase-3, -8 and -9 activities, respectively. Briefly, whole cell lysates were obtained after incubation of cells for different periods of time in the presence or absence of 500 µM DCA or CDCA and further scraping the cell monolayers in ice-cold PBS and centrifugation. Afterwards, cell pellets were resuspended in extraction buffer (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 1% Nonidet P-40, 0.4 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin), incubated on ice for 30 min, centrifuged ($20,000 \times g$, 30 min) and the supernatants were used as cytosolic extracts. These extracts were incubated with the corresponding fluorogenic substrates and caspase activities were measured as previously described [19].

Western blot analysis

Nuclear extracts were obtained as previously described [22]. Briefly, harvested cells ($2\text{--}3 \times 10^7$) were washed twice with ice-cold PBS, resuspended in 180 µl of ice-cold hypotonic lysis buffer [10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA containing protease and phosphatase inhibitors (1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 nM pepstatin A, 1 µg/ml leupeptin, 1 nM Na_3VO_4 , 1 nM NaF, 1 nM β -glycerophosphate and 1 mM dithiothreitol)], incubated on ice for 10 min followed by addition of 20 µl of Nonidet P-40; after 3 min at room temperature, cells were vortexed and the cytosolic fraction was obtained by centrifugation for 5 min at $2,500 \times g$. The nuclear pellet was resuspended in 60 µl of high-salt extraction buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA containing protease and phosphatase inhibitors) and incubated with shaking at 4°C for 1 h. The nuclear extract was centrifuged for 5 min at $16,000 \times g$ and the supernatant stored at -80°C .

For Western blotting, equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE after heat denaturing in the presence of 5% β -mercaptoethanol. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and analyzed by Western blot as described elsewhere [23]. Development was performed using the “Amersham ECL Western blot system” (GE Healthcare, Barcelona, Spain), and chemiluminescence

was detected in a LAS-3000 mini image capture system from Fujifilm. Densitometric analysis was performed obtaining volumograms using Multi Gauge v3.0 (Fujifilm) or Quantity One v4.3.1 (Bio-Rad). Data were normalized against the intensity of the bands corresponding to vinculin (whole cell extracts) as control of even protein loading. Protein content was determined in quadruplicate samples using the D_C Protein Assay (Bio-Rad).

Analysis of conformational changes in Bax

Cells (two dishes of 10 cm diameter were used per sample) were left untreated or subjected to 1 h treatment with 500 μ M DCA or CDCA [without or after preincubation for 30 min with 50 μ M Z-VAD-FMK (pan-caspase inhibitor)], or 100 μ M cisplatin (24 h), and then lysed in CHAPS lysis buffer (1% CHAPS, 10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 μ M leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin) to preserve the conformation of Bax, as previously described [24]. Cells lysed in Triton X-100-containing buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% glycerol, and protease inhibitors) to fully expose the N-20 epitope, were used as a positive control. These lysates were either used as whole cell extracts or for immunoprecipitation. For the latter, a 50 μ l aliquot of protein G-Sepharose beads was incubated 1 h at 4°C with 7.5 μ l of polyclonal anti-Bax antibody (200 μ g/ml), recovered by centrifugation and washed twice with 1 ml of the corresponding lysis buffer. The lysates were centrifuged at 13,000 \times g for 5 min to remove nuclei and cellular debris. After determination of protein concentration and normalization, the supernatants were added to the bead suspension and then mixed by rotation for 2 h at 4°C. Immunoprecipitates were collected by a brief spin and washed three times with 1 ml of lysis buffer before fractionation by SDS-PAGE, which was followed by Western blot analysis with the polyclonal anti-Bax antibody.

Statistical analysis

The normal distribution of data was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. ANOVA analyses were performed to determine if there were significant differences in the time course of LDH release into the cell culture medium, the percentages of apoptotic and necrotic cells, caspase induction, and in the generation of ROS upon DCA and CDCA treatments. The differences between the mean values were analyzed with SigmaPlot v11.2 (Systat Software, Erkrath, Germany) and using Student's *t*-test (two-tailed). Statistical significance was considered to be achieved at the $P < 0.05$ level.

Results

Cell viability, differentiation, detachment and LDH release

Cell viability was analyzed by measuring ATP content after treatment with different concentrations of DCA and CDCA for 2 h, using 0.5% DMSO as control (Fig. 1a). DCA and CDCA treatments (but not CA or UDCA; not shown) decreased cell viability in a concentration-dependent manner, being this effect slightly stronger for the latter. CDCA reduced cell viability by around 44% at 500 μ M whereas DCA, at this concentration, reduced viability by 34%. As butyrate, other physiological intestinal luminal factor, induces cell death via apoptosis through terminal differentiation [20, 21], we decided to analyze the induction of cell differentiation. Figure 1b shows alkaline phosphatase (ALP) activity measured in cells that remained in culture after 4 days treatment with different concentrations of bile acids or butyrate (ranging from 7–8 $\times 10^5$ cells in untreated controls down to $\sim 1 \times 10^5$ cells in 8 mM butyrate and 250 μ M CDCA treated cells). BCS-TC2 cells presented a low basal differentiation degree and butyrate induced cell differentiation with a highly significant increase in ALP activity (16- and 23-fold after treatment with 4 mM or 8 mM butyrate, respectively). On the contrary, DCA and CDCA did not increase ALP activity indicating that the reduction in cell viability is not due to cell death via terminal differentiation.

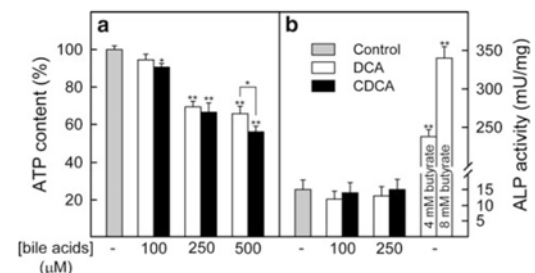


Fig. 1 Cell viability and differentiation after treatment of BCS-TC2 cells with DCA and CDCA. **a** Cell viability was determined after exposure of exponentially growing cultures to the indicated concentrations of DCA or CDCA for 2 h and measurement of ATP content by a fluorimetric method as described in Materials and methods. Data are normalized versus control cultures (100%) and represent mean values (\pm SD) from three independent experiments with quadruplicate samples. **b** Differentiation of BCS-TC2 was determined by measurement of ALP activity after treatment with DCA or CDCA for 4 days. Parallel incubations with 4 and 8 mM butyrate were carried out as positive differentiation controls. Activity is expressed in mU/mg and represents mean values (\pm SD) of three independent experiments with triplicate samples. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

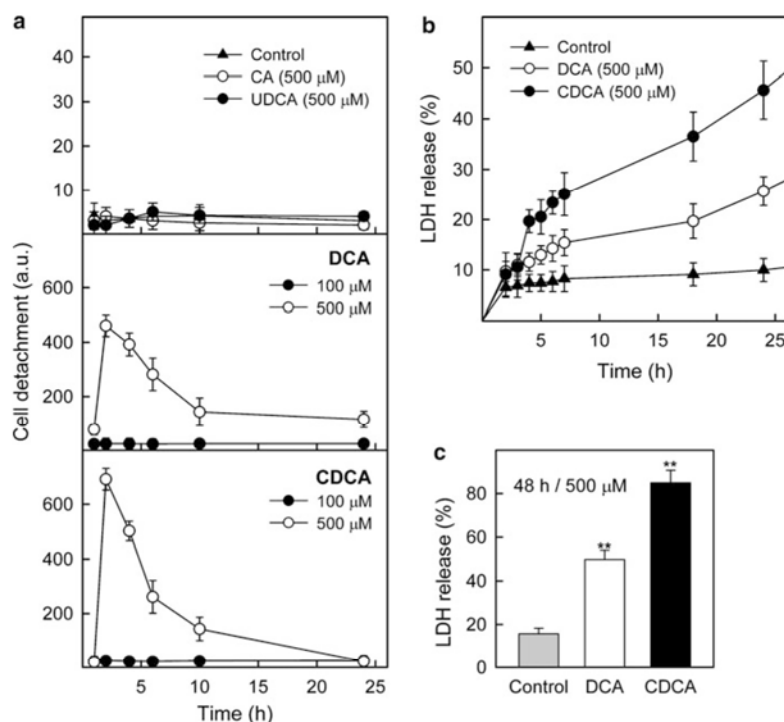


Fig. 2 Cell detachment and membrane permeation after treatment of BCS-TC2 cells with bile acids. **a** Cell detachment was measured at different treatment times with CA, UDCA, DCA or CDCA on exponentially growing cells by centrifugation of the culture medium and recovery of detached cells. After resuspension in PBS, the number of detached cells was measured by flow cytometry as described in Materials and methods. Data are expressed in arbitrary units (a.u.) and represent mean values (\pm SD) of two independent experiments with triplicate samples. Two-way ANOVA analysis reveals only significant differences ($P < 0.001$) in the time course of cell detachment between cells treated with 500 μ M DCA and CDCA. **b, c** LDH activity was measured in the supernatants of cell cultures

treated for up to 48 h with 500 μ M DCA or CDCA as described in Materials and methods and is expressed as percentage of the total LDH released in Triton X-100 lysed cells in parallel wells. Data correspond to mean values (\pm SD) of three independent experiments with at least three samples per time point. Two-way ANOVA analysis reveals that the time course of LDH release is significantly higher for CDCA and DCA groups compared to control cultures, and CDCA over DCA group (in all cases, $P < 0.001$). This difference was significantly higher for the CDCA group compared to control or DCA group after 4 h treatment ($P < 0.01$); DCA group differed from controls after 5 h treatment ($P < 0.05$; $P < 0.01$ after 6 h). (** $P < 0.01$)

Microscopic observation of bile acid-treated cultures revealed rounded cells that detached from the monolayers. Time-course analysis of cell detachment of BCS-TC2 cells was performed after treatment with 100 and 500 μ M of different bile acids (CA, UDCA, DCA and CDCA). The hydrophilic bile acids CA and UDCA did not alter the number of detached cells (Fig. 2a, top panel). In contrast, there was a significant increase in cell detachment after treatment with 500 μ M DCA or CDCA, reaching a maximum after 2 h. At longer treatment times the apparent decrease in the number of detached cells is a consequence of cell lysis. No significant cell detachment was observed at 100 μ M (middle and lower panels; Fig. 2a).

A clear reduction in the number of intact detached cells was observed after 2 h of treatment with both 500 μ M DCA or CDCA, suggesting that detached cells were lysed at

incubation times longer than 2 h at this concentration. To confirm this hypothesis, cell membrane damage was evaluated measuring lactate dehydrogenase (LDH) release into the culture media. Consistent with the data from cell viability experiments, treatment of BCS-TC2 cells with 500 μ M CA or UDCA did not increase the release of LDH to the culture medium (not shown), but it increased significantly after treatment with 500 μ M DCA for 5 h or CDCA for 4 h when compared with untreated controls (Fig. 2b). Moreover, the increase in LDH activity also correlated with the time point in which the number of detached cells started to decrease. The process of cell lysis increased in a time-dependent manner; after 24 h, released LDH was 2.6- and 4.6-fold higher (DCA and CDCA, respectively) than in control cultures, and continued increasing thereafter (3.2- and 5.4-fold higher after 48 h treatment, respectively; Fig. 2c).

Induction of apoptosis by DCA and CDCA

We analyzed the externalization of phosphatidylserine (indicative of apoptosis) in the plasma membrane of BCS-TC2 cells and membrane integrity (PI staining) (Fig. 3a). Taking into account that both DCA and CDCA promote cell detachment, we analyzed whole cultures as well as detached cells and monolayers separately. In whole cultures, an increase in the percentage of apoptotic cells (12–15% increase) and of PI-positive cells (13–20% increase) was detected after 2 h treatment with DCA or CDCA compared to untreated control cultures. When monolayers were considered, almost no increase in the percentage of apoptotic and necrotic cells was found. Detached cells were only analyzed in cultures treated with bile acids as the number of non-adherent cells in control cultures was very low. After treatment with DCA or CDCA, detached cells were mainly apoptotic (Fig. 3a, lower panels) indicating that cell detachment was a consequence of an apoptotic process. Even after treatment with 100 μ M DCA or CDCA, the small number of cells detached from the monolayer (Fig. 2a) also showed apoptotic features (Fig. 3b). Time course of apoptosis induction in detached cells revealed a transitory increase in the percentage of apoptotic cells in the first hours of treatment with 500 μ M DCA or CDCA, with a pattern similar to that observed for the number of detached cells (Fig. 2a). When the number of apoptotic cells decreased, a concomitant increase in the percentage of necrotic cells was observed, confirming that the reduction in the number of detached cells was a consequence of a secondary necrosis.

Apoptosis in detached cells was further confirmed by nucleosomal DNA fragmentation assays (Fig. 4). Cells released after treatment for 2 or 6 h treatment with 500 μ M DCA or CDCA showed the characteristic profile of internucleosomal DNA degradation, although it was not detected at 100 μ M. Monolayer extracts did not show significant DNA laddering confirming that the number of apoptotic cells in the monolayer was very small (not shown).

Caspase activation and target degradation

Caspase-8 activity was not significantly affected by treatment with 500 μ M DCA or CDCA; only a slight increase was detected after 1–2 h treatment with CDCA (<1.7-fold), which is most likely due to an unspecific hydrolysis triggered by other activated caspases (Fig. 5a, upper panel). On the contrary, caspase-9 activity increased in BCS-TC2 cells after treatment with DCA and CDCA ($P < 0.001$) reaching a maximum around 1–2 h, and decreasing afterwards (Fig. 5a, middle panel). CDCA showed the most significant effect increasing more than 3-fold this

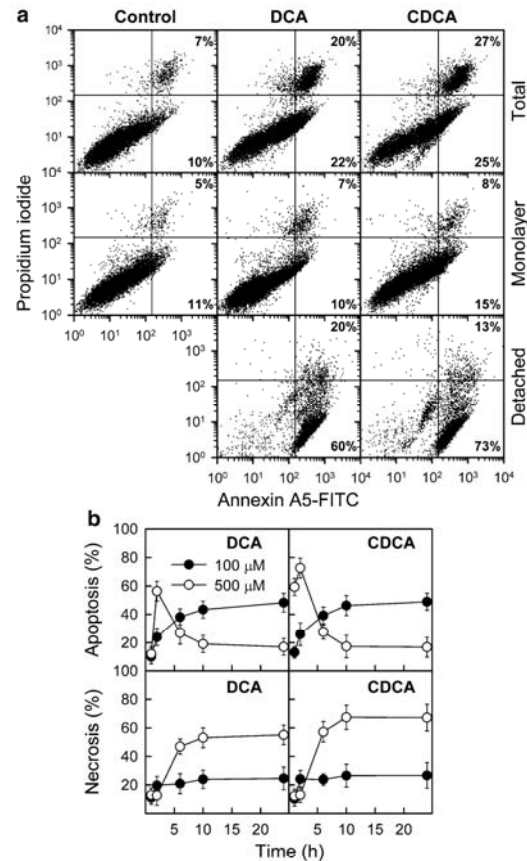


Fig. 3 Loss of membrane asymmetry and membrane integrity in BCS-TC2 cells treated with DCA and CDCA. Exponentially growing cells were incubated with 500 μ M DCA or CDCA for different periods of time; detached cells were collected from the culture medium and those from the monolayers were harvested by trypsinization. Detached cells or monolayers were either analyzed independently or together (total) after resuspension at 5×10^5 cells/ml in buffer containing FITC-labeled annexin A5 and propidium iodide as described under Materials and methods. **a** Dot plots are shown indicating the percentage of apoptotic cells (lower right quadrant) or cells with loss of membrane integrity (upper right quadrant) after 2 h treatment with 500 μ M DCA or CDCA. Representative plots from five different experiments are shown. The dot plot from floating cells in the control is not shown as the number of cells was very low. **b** The time course of the percentage of apoptosis or necrosis in floating cells from cultures treated with 100 μ M or 500 μ M DCA or CDCA was determined as above and data represent mean values (\pm SD) of five different experiments. Two-way ANOVA analysis reveals only a significant difference ($P < 0.001$) between 500 μ M CDCA and DCA groups, regarding the percentage of both apoptosis and necrosis induced by the treatments

enzymatic activity, while DCA only reached a 2-fold increase. These data suggest that bile acids altered mitochondrial functionality after short incubation times.

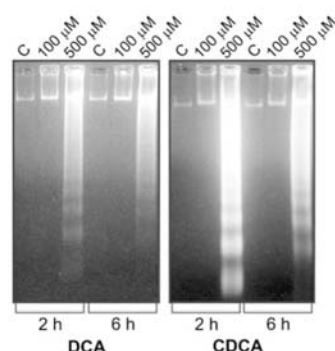


Fig. 4 Chromosomal DNA fragmentation in DCA- and CDCA-treated BCS-TC2 cells. Exponentially growing BCS-TC2 cells were incubated with DCA or CDCA (100 or 500 μ M; C: untreated controls), and after 2 and 6 h, detached cells were collected and genomic DNA was isolated and analyzed as described in [Materials and methods](#) for nucleosomal fragmentation. Representative gels from three experiments are shown

Both DCA and CDCA induced the activity of effector caspase-3 (Fig. 5a, lower panel) which significantly differed from control cultures ($P < 0.001$). After 1 h treatment with CDCA, there was a 5–6 fold increase in caspase-3 activity, which gradually decreased back to control levels after 4 h. The effect induced by DCA was again less acute, with a slower caspase-3 activity increase, peaking (~ 3 -fold) 4 h after treatment and recovering control levels after 6 h. The time-course of caspase-3 activation was very similar to that observed for caspase-9, cell detachment and annexin A5-FITC staining. As a whole, these results suggest that secondary necrosis follows the initial apoptotic events, with subsequent appearance of cell damage.

We checked total levels and activation of Bax. As observed in Fig. 5b and Table 1, incubation of BCS-TC2 cells with 500 μ M DCA or CDCA yielded Bax activation (without significant differences between both treatments when normalized versus total Bax), as also observed in the positive control using cisplatin or in the lysate obtained in the presence of Triton X-100 instead of CHAPS. No significant variation in total Bax levels was detected ($P > 0.05$), but anti-apoptotic Bcl-2 levels were reduced in a concentration dependent manner in DCA (down to $29 \pm 6\%$ at 500 μ M), CDCA (down to $21 \pm 4\%$ at 500 μ M) and cisplatin (down to $11 \pm 4\%$ at 100 μ M) treated cultures (Fig. 5b, c; Table 1) in parallel with the proteolytic cleavage of pro-caspase-9 that leads to its activation (Fig. 5c; arrows). Interestingly, inhibition of caspase activity with the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK blocks both Bax activation and Bcl-2 degradation induced by bile acids (Fig. 5b and Table 1; no significant differences with untreated controls).

We have also analyzed the degradation of several previously described targets of caspase-3 (Fig. 5d). Nuclear extracts from BCS-TC2 cells treated with different concentrations of DCA and CDCA for 1 h showed the characteristic cleavage profile of Lamin B1 and PARP triggered by caspases during the apoptotic process [25, 26]. Moreover, we observed a bile acid concentration-dependent decrease in p21 protein levels (down to 11 ± 6 and $35 \pm 8\%$ at 500 μ M DCA and CDCA, respectively; Table 1) and, to a lower extent, of p53 (down to 78 ± 7 and $49 \pm 8\%$ at 500 μ M DCA and CDCA, respectively; Table 1). Both proteins have also been previously described as caspase substrates cleaved during the apoptotic program [27, 28].

Bile acid-induced ROS generation and alterations in mitochondrial permeability

Caspase-9 activation is usually related to mitochondrial modifications that involve dispersion of mitochondrial membrane potential. Thus, we analyzed whether bile acids altered the mitochondrial membrane potential of BCS-TC2 cells by using 500 μ M CDCA, in total cultures, monolayers and detached cells. Rhodamine 123 was used as a probe for transmembrane mitochondrial potential. In control cells, two cell populations were detected. The major one showed a higher membrane potential and exclusively comes from the monolayer. A very small percentage of cells showed a reduced mitochondrial membrane potential, and this population was almost exclusively coming from detached cells (Fig. 6). After treatment with 500 μ M CDCA there was a substantial increase in the amount of cells with a low membrane potential either in total cultures or in cells that remained attached. This effect could be observed after 15–30 min of treatment and did not increase further with longer incubation times. On the other hand, almost the whole population of detached cells showed a low membrane potential throughout the treatment, probably corresponding with the apoptotic cells observed during CDCA treatment. These detached cells were almost absent in control cultures, but increased rapidly with CDCA treatment.

We also measured ROS generation in the absence or presence of the ROS scavenger NAC. Figure 7a shows that incubation of BCS-TC2 cells with 250 μ M DCA or CDCA induced a continuous time-dependent increase in ROS production (slightly higher for CDCA), at least up to 120 min, that was not detected in the presence of NAC. At higher bile acid concentration (500 μ M), ROS production was faster and to a greater extent, but reached a maximum in both cases at 30 min, decreasing thereafter likely due to extensive cell damage and leakage. Again, the presence of NAC abolished ROS generation. No significant increase in

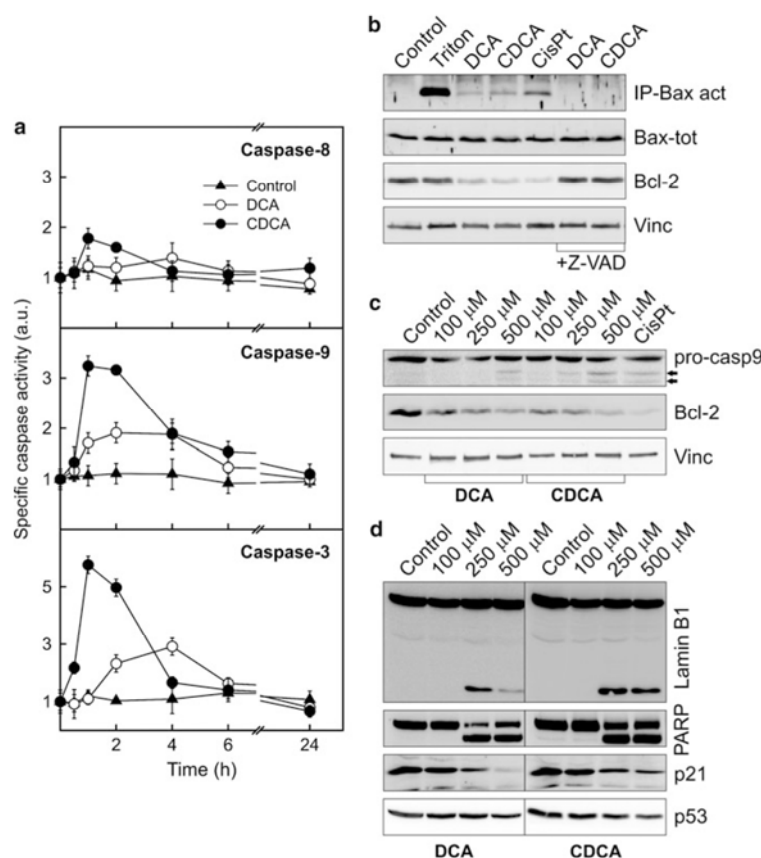


Fig. 5 Effect of DCA and CDCA treatments in caspase activation, levels of Bcl-2 and Bax, Bax activation and degradation of caspase targets in BCS-TC2 cells. **a** BCS-TC2 cells were treated with 500 μ M DCA or CDCA and, at different time points up to 24 h, total cultures were collected by scraping the plates and centrifugation of the cells. Caspase activities were determined using specific fluorogenic substrates as described in Materials and methods. Data are expressed in arbitrary units (a.u.) referred to activity values obtained at time zero. **b** Activation of Bax was detected by immunoprecipitation of activated Bax using the N-20 polyclonal antibody as described in Materials and methods. Exponentially growing cells were incubated with 500 μ M DCA or CDCA for 1 h with or without 30 min preincubation with 50 μ M Z-VAD-FMK (+Z-VAD). Cisplatin

incubation (CisPt; 100 μ M, 24 h) was also carried out as a control of apoptosis. Total Bax and Bcl-2 were detected by Western blot of whole cell extracts; vinculin levels are shown as protein loading controls. **c** Western blots showing caspase-9 activation (arrows show fragments corresponding to proteolytic activation of pro-caspase-9) and decrease in Bcl-2 levels in whole cell extracts from BCS-TC2 treated with 500 μ M DCA or CDCA for 1 h. Cisplatin incubation (100 μ M, 24 h) was also carried out as a control of apoptosis; blot anti-vinculin is included as control of even protein loading. **d** Degradation of caspase targets detected by Western blot analysis of nuclear extracts from BCS-TC2 cells treated with DCA or CDCA. Blots from (b–d) are representative of three to six different experiments

ROS generation was detected at 100 μ M DCA or CDCA (not shown).

Finally, we used different specific inhibitors of membrane-associated enzymes to investigate the potential involvement of these enzymes in ROS generation after bile acid treatment. We have analyzed the effect of specific inhibitors of NAD(P)H oxidases (apocynin and DPI) and PLA₂ (quinacrine) in ROS production (Fig. 7b) and in ATP levels (Fig. 7c) induced by DCA and CDCA. Preincubation

with the inhibitors alone did not significantly alter ($P > 0.05$) ROS or ATP levels (data not shown). Interestingly, apocynin and DPI completely blocked the generation of ROS induced after 30 min treatment with 500 μ M DCA or CDCA, whereas only a partial reduction in ROS generation was achieved with quinacrine (larger with DCA treatment). This effect against ROS production was always reflected in a partial protection against ATP depletion, being DPI pretreatment the most effective (complete

Table 1 Densitometric analysis and statistics corresponding to Western blots from Fig. 5

Figure 5b	Bcl-2/Vinc (<i>n</i> = 5)	Bax ^{total} /Vinc (<i>n</i> = 4)	Bax ^{active} /Bax ^{total} (<i>n</i> = 4)
Control	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.03	Not detected
Triton	0.91 ± 0.13	0.95 ± 0.07	1.00 ± 0.05
DCA	0.32 ± 0.03**	1.19 ± 0.13	0.12 ± 0.08
CDCA	0.22 ± 0.02**	1.12 ± 0.09	0.20 ± 0.09
CisPt	0.11 ± 0.02**	0.89 ± 0.12	0.39 ± 0.06
DCA + Z-VAD	0.91 ± 0.09	1.03 ± 0.06	Not detected
CDCA + Z-VAD	0.94 ± 0.07	1.07 ± 0.08	Not detected
Figure 5c, d	Bcl-2/Vinc (<i>n</i> = 3)	Nuclear p21 (<i>n</i> = 6)	Nuclear p53 (<i>n</i> = 6)
Control	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04
DCA 100 μM	0.50 ± 0.10**	0.78 ± 0.12*	0.91 ± 0.11
DCA 250 μM	0.34 ± 0.07**	0.43 ± 0.06**	0.91 ± 0.07
DCA 500 μM	0.26 ± 0.03**	0.11 ± 0.06**	0.78 ± 0.07*
CDCA 100 μM	0.47 ± 0.12**	0.82 ± 0.09*	0.74 ± 0.10*
CDCA 250 μM	0.30 ± 0.04**	0.54 ± 0.07**	0.59 ± 0.08**
CDCA 500 μM	0.20 ± 0.02**	0.35 ± 0.08**	0.49 ± 0.08**
CisPt	0.08 ± 0.02**		

Data correspond to mean values (± SD) of the normalized densitometric analysis of the intensity of the bands from 3 to 6 blots from independent experiments. They are expressed in arbitrary units with a value of one for controls except for Bax^{active}/Bax^{total}, where a value of one was assigned to untreated cells lysed with Triton X-100 instead of CHAPS (see [Materials and methods](#)). Activated Bax was never detected in controls or in DCA or CDCA treated cultures in the presence of the caspase inhibitor Z-VAD-FMK. Asterisks indicate *P* values corresponding to the comparison of mean values with those obtained from the corresponding controls (**P* < 0.05; ***P* < 0.01). Anova analysis of the concentration-dependent effect of DCA or CDCA treatments on BCS-TC2 cells does not reveal significant differences between both treatments regarding Bcl-2 and nuclear p21 levels, but there is a significant difference in nuclear p53 levels between both treatments

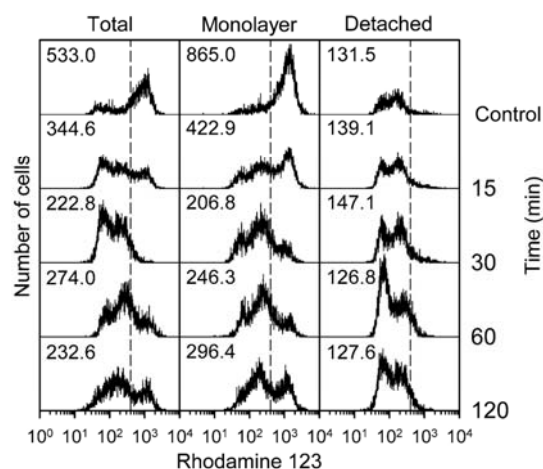


Fig. 6 Effect of CDCA treatment on mitochondrial membrane potential in BCS-TC2 cells. Exponentially growing BCS-TC2 cells were incubated with 500 μM CDCA for up to 120 min. Detached cells were collected from the culture medium and cells from the monolayers were detached by trypsinization. Detached cells or cells from the monolayers were analyzed independently or together (total) after resuspension at 5×10^5 cells/ml in PBS. After addition of rhodamine 123 (mitochondrial membrane potential) and propidium iodide, cells were analyzed by flow cytometry. Representative histograms and total MFIs from three independent experiments are shown

protection against DCA treatment). However, a low level of cytotoxicity was still detected pointing to additional minor mechanisms by which bile acids still exert cell damage.

Discussion

Bile acids are physiological steroids whose essential role is to facilitate the digestion and absorption of dietary fats. Despite this beneficial property, their presence has been related with different cytotoxic effects [29, 30], and these effects are highly stereospecific and enantiospecific [31]. Several studies are being carried out in vitro using cell cultures from colorectal carcinomas, mainly the tumorigenic HCT-116, HT-29 and Caco-2 cells. However, the employment of non-tumorigenic cells is more relevant in order to mimic the early conditions of the transformation process. Here we have analyzed the effects of the primary and secondary bile acids CDCA and DCA, respectively, on non-tumorigenic and Bcl-2 positive human colon adenocarcinoma BCS-TC2 cells that are still able to differentiate and undergo terminal apoptosis induced by butyrate [16, 20, 21].

Bile acids can interact with membranes in a non-specific way and exert their cytotoxic effects through their

1064

Apoptosis (2011) 16:1054–1067

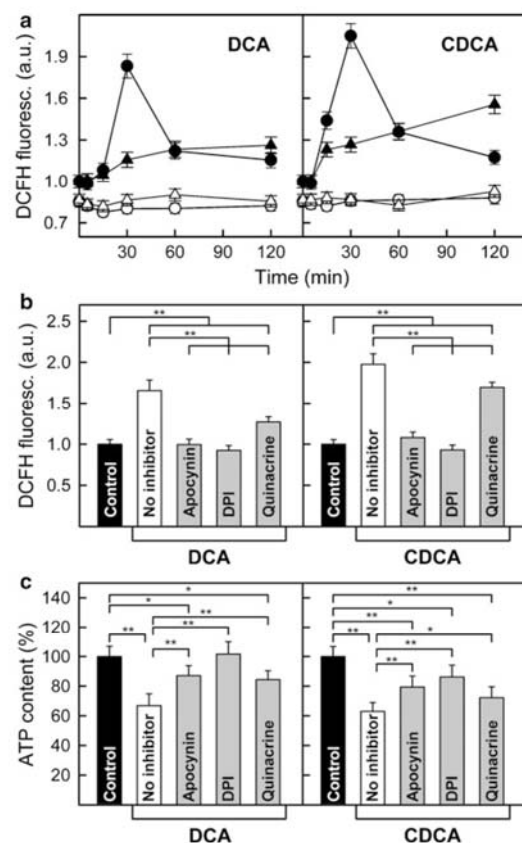


Fig. 7 Effect of bile acid treatment on ROS formation in BCS-TC2 cells. **a** ROS production was measured on 96-well plates after treatment of exponentially growing BCS-TC2 cells with DCA or CDCA at different concentrations (triangles, 250 μ M; circles, 500 μ M) and times of incubation, with (empty symbols) or without (black symbols) 1 h pretreatment with 10 mM NAC. Data represent mean values (\pm SD) of two independent experiments with quadruplicate samples. ANOVA analysis reveals significant differences in the time courses of ROS production between DCA and CDCA at both 250 and 500 μ M ($P < 0.001$). **b** ROS production was measured as above after 2 h preincubation in the presence of 100 μ M apocynin, 50 μ M DPI or 5 μ M quinacrine followed by 30 min treatment with 500 μ M DCA (left panel) or CDCA (right panel). **c** ATP content was determined in parallel cultures to those in (b) by a bioluminescence method as described in Materials and methods and normalized versus control cultures (100%). Data in (b) and (c) represent mean values (\pm SD) from two independent experiments with quadruplicate samples (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

detergent-like properties. In addition, it is generally assumed that their toxicity is strongly dependent on their hydrophobicity. It has been postulated that highly hydrophobic bile acids may diffuse through the plasma membrane and interact with DNA and/or intracellular molecules, causing DNA damage and triggering signaling

cascades [31, 32]. However, although bile acid uptake in hepatocytes is higher for hydrophobic bile acids, colon carcinoma cells behave differently. It has been described that there is only a minimal uptake of hydrophobic DCA in HCT-116 and HT-29 cells but still displays high levels of apoptosis [32]. Thus, the increased cytotoxicity of these bile acids must depend on events that take place in the plasma membrane, as activation of NAD(P)H oxidase or PLA₂, which increase ROS levels [6, 33]. In accordance with these reports, we have detected that the less hydrophobic bile acids CA and UDCA have no cytotoxic effects on BCS-TC2 cells, whereas the highly hydrophobic ones DCA and CDCA significantly decrease cell viability confirming our previous finding regarding the cytotoxic effects of several bile acids in these cells [16].

We have observed that the decrease in cell viability and increased cell detachment is dependent on the nature of the bile acid, being higher for CDCA than for DCA, and that these effects are time- and concentration-dependent. Cell detachment is only observed at the higher bile acid concentration, reaching an apparent maximum after 2 h treatment with both bile acids, decreasing afterwards. This behavior could be explained by the fact that, during the first hours of treatment, DCA and CDCA are able to trigger the apoptotic program, with the consequent cell detachment. The induction of cell detachment by bile acids in colon carcinoma cells has been previously reported for HCT-116 and HT-29 cells, and DAPI staining revealed apoptotic nuclear morphology in the detached cells [31]. The apparent decrease in the number of detached cells that we detect after 2 h is probably due to extensive cell damage or lysis, as we confirmed by the analysis of LDH activity into the culture medium. This cell leakage is likely consequence of two different pathways: a post-apoptotic event (secondary necrosis) and the detergent-like properties of these bile acids.

We have confirmed that DCA and CDCA initially trigger apoptosis in BCS-TC2 cells. Loss of membrane asymmetry, characteristic of apoptotic cells, was evident in detached cells and also in total cultures. Moreover, these data are in good agreement with the detection of nucleosomal DNA fragmentation detected after incubation of BCS-TC2 cells for 2 or 6 h with 500 μ M DCA or CDCA. At longer incubation times, the percentage of apoptotic cells apparently declines and this reduction is correlated with an increase in the percentage of necrotic cells. This process is quite fast at 500 μ M but is delayed at lower concentrations (i.e., no nucleosomal DNA fragmentation is observed at 100 μ M even after 6 h of treatment although membrane asymmetry is detected in detached cells). Our results show that detached apoptotic cells suffer a process of secondary necrosis after longer exposure to these bile acids. A similar effect has been previously described after

LCA treatment in HCT-116 cells [31]. The effect of bile acids is highly dependent on the characteristics of the cells, as HT-29 and HCT-116 cells present different sensibility to DCA and CDCA induced apoptosis [31] than BCS-TC2 cells.

Apoptosis can be triggered by two main molecular pathways, the extrinsic death-receptor pathway and the intrinsic mitochondrial pathway. The former is related with the interaction of a pro-apoptotic stimulus with cell death receptors, leading to the activation of caspase-8. On the other hand, the pro-apoptotic stimuli could lead to a series of mitochondrial changes that trigger caspase-9 activation. Our data show that DCA and CDCA are able to specifically activate caspase-9 with no effect on caspase-8. Caspase-9 activation leads to the stimulation of the effector caspase-3, and the development of the full apoptotic program. Within this program, we have confirmed the degradation of several well-known caspase targets in nuclear extracts from BCS-TC2 cells, among them PARP, Lamin B1, p21 and, to a lower extent, p53. Our data show that apoptosis induced by DCA and CDCA in BCS-TC2 cells follows the intrinsic mitochondrial pathway. This receptor independent apoptotic response has also been reported for other colon carcinoma cell lines, some of them expressing CD95/Fas death receptor (Caco-2 and SW620) and other lacking it (HT-29 and SW480) [34]. In contrast, in HCT-116 cells, it has been reported that DCA initially activates caspase-9 but it is followed also by caspase-8 activation [35]. Although both DCA and CDCA work through the same pathway, the effect of CDCA is more pronounced and faster than that of DCA. A shift from apoptotic to necrotic cells explains why we observed apparently transient activation of caspases and other apoptotic features.

The Bcl-2 family of proteins plays crucial roles in the mitochondrial apoptotic pathway. This family includes anti-apoptotic and pro-apoptotic members (i.e. Bcl-2 and Bax, respectively). Our data indicate that bile acids do not alter total Bax levels but induce a conformational change that exposes the N-terminal epitope. This change is essential for oligomerization and consequent integration of Bax into the mitochondrial membrane that leads to alteration of its permeability, as it has also been reported in apoptosis induced by other stimuli including detergents as Triton X-100 [36]. Bax activation is accompanied by a decrease in the levels of anti-apoptotic Bcl-2 levels, and both effects are dependent on caspase activation. The dissipation of the mitochondrial membrane potential precedes Bax activation/Bcl2 degradation in bile acid-induced apoptosis in BCS-TC2 cells.

We have shown that Bax-dependent mitochondrial membrane alteration is secondary to caspases activation. Then, how is the initial caspase activation triggered? Several studies have described the ability of bile acids to

generate ROS triggering the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) [10, 37]. In this regard, bile acid-induced ROS generation seems to be multifactorial. One of the main sources of ROS production by bile acids in colon cells is the activation of several membrane-associated enzymes, such as NAD(P)H oxidases and PLA₂. These enzymes are likely activated by alterations in the structure and composition of the plasma membrane, being this effect closely related with the hydrophobicity and detergent effect of bile acids [38, 39]. Using different specific inhibitors we have observed that DCA and CDCA induce ROS production in BCS-TC2 cells mainly through an activation of NAD(P)H oxidases with a contribution of PLA₂. Regarding the latter, it has been previously described that bile acids are able to increase PLA₂ activity in Caco-2 cells by inducing alterations in the transepithelial permeability [8]. It is also well established that the activation of NAD(P)H oxidases, and consequent increase in ROS production, is essential for bile acid-induced apoptosis in hepatocytes [40]. In any case, our results point out to potential additional minor sources of cell damage, as inhibition of NAD(P)H oxidases and PLA₂ activities did not completely protect BCS-TC2 cells against the cytotoxic effects of bile acids. On this idea, bile acids may diffuse into the cytosol inducing perturbations in the mitochondria or other organelles.

The increased ROS generation after bile acid treatment is enough to promote the mitochondrial permeability transition. This bile acid-induced MPT can lead to the release of pro-apoptotic proteins to the cytosol, such as cytochrome *c* or SMAC/Diablo and, subsequently, activate initiator caspase-9. Our results demonstrate that CDCA, and to a lower extent DCA, are able to increase ROS generation in BCS-TC2 cells, and the increased levels of ROS are correlated with a loss in the mitochondrial membrane potential, pointing out to a bile acid-induced MPT. In this regard, in rat hepatocytes it has been postulated that the ROS-induced MPT in the presence of bile acids is enough to initiate the apoptotic process by the release of cytochrome *c* to the cytosol due to the presence of depolarized mitochondria [41, 42]. Moreover, ROS may facilitate not only the activation of Apaf-1 and caspase-9 by oxidative modifications, but also their interaction to assemble the apoptosome [43]. Finally, the massive impairment of mitochondrial activity due to ROS-induced MPT and Bax-dependent pore formation could deplete the ATP from the cells to an extent where a switch occurs between apoptosis and necrosis [44].

In summary, our findings demonstrate that DCA and CDCA trigger apoptosis in BCS-TC2 cells by disruption of mitochondrial function. We propose a three-step mechanism for the induction of apoptosis by bile acids in BCS-TC2 cells (Fig. 8). First, bile acids activate membrane-associated

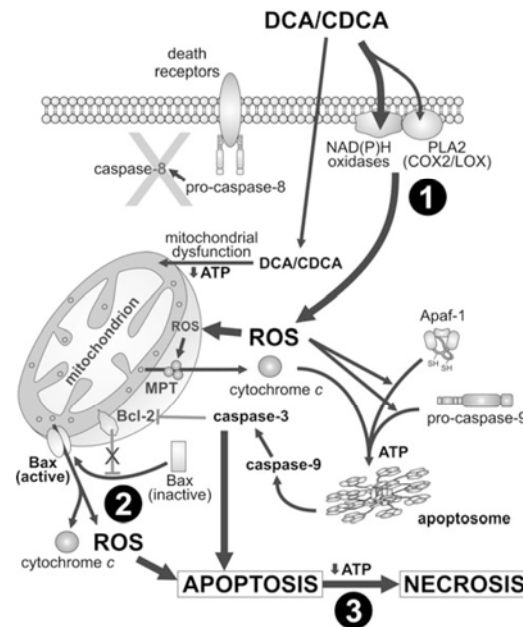


Fig. 8 Proposed mechanism for DCA- and CDCA-induced apoptosis in BCS-TC2 cells. ROS production by activation of membrane associated enzymes [mainly NAD(P)H oxidases and to a lower extent PLA₂] is the main triggering factor for DCA- and CDCA-induced apoptosis (1). Due to their hydrophobic nature, bile acids may also diffuse through the plasma membrane directly into the cytosol, potentially inducing perturbations in the mitochondria with a subsequent alteration in oxidative phosphorylation that leads to further ROS formation and ATP depletion. ROS alter mitochondria with induction of MPT, which provokes the release of cytochrome *c* and ROS, among other factors, which together with Apaf-1 and pro-caspase-9 form the apoptosome. Initiator caspase-9 is then activated followed by effector caspase-3 (and probably other effector caspases) with activation of DNA degrading enzymes, and cleavage or degradation of other targets among them anti-apoptotic Bcl-2. The decrease in Bcl-2 levels allows Bax activation that oligomerizes in the mitochondrial membrane creating new pores and further release of cytochrome *c* and ROS (2). Finally, the overall cell damage together with the decrease in ATP levels due to mitochondrial dysfunction lead in vitro to secondary necrosis and cell lysis (3)

enzymes that generate an oxidative stress that promotes the MPT, allowing the release of pro-apoptotic factors which activate initiator caspase-9. Second, caspase-9 activates caspase-3, promoting the cleavage of Bcl-2, among other targets, that allow Bax activation and oligomerization. New pores are formed in the mitochondria, establishing a feedback loop that amplifies apoptosis. Third, a switch between apoptosis and necrosis occurs in vitro due to impaired oxidative phosphorylation and subsequent loss of energy requirements for apoptosome functionality and cell integrity maintenance.

Acknowledgments We are thankful to the staff from the Microscopy and Flow Cytometry Center from the Complutense University of Madrid for their skillful assistance. This work was supported by grants BFU2005-02671 and BFU2008-04758 from the DGES (Spain).

Conflict of interest None.

References

- Hofmann AF, Hagey LR (2008) Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 65:2461–2483
- Monte MJ, Marín JJ, Antelo A, Vázquez-Tato J (2009) Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 15:804–816
- Longpre JM, Loo G (2008) Protection of human colon epithelial cells against deoxycholate by rottlerin. *Apoptosis* 13:1162–1171
- Stadler J, Stern HS, Yeung KS et al (1988) Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids. *Gut* 29:1326–1331
- Hofmann AF (1999) The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 159:2647–2658
- Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H (2005) Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res* 589:47–65
- Benedetti A, Alvaro D, Bassotti C et al (1997) Cytotoxicity of bile salts against biliary epithelium: a study in isolated bile ductule fragments and isolated perfused rat liver. *Hepatology* 26:9–21
- Araki Y, Katoh T, Ogawa A et al (2005) Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radic Biol Med* 39:769–780
- Sola S, Brito MA, Brites D, Moura JJ, Rodrigues CM (2002) Membrane structural changes support the involvement of mitochondria in the bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Clin Sci (Lond)* 103:475–485
- Sokol RJ, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Kobak GE, Gumprecht E (2005) Human hepatic mitochondria generate reactive oxygen species and undergo the permeability transition in response to hydrophobic bile acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 41:235–243
- Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H et al (1999) Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 103:137–145
- Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y et al (2001) The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem* 276:38610–38618
- Tsuchiya S, Tsuji M, Morio Y, Oguchi K (2006) Involvement of endoplasmic reticulum in glycochenodeoxycholic acid-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 166:140–149
- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Pelli MA, Morozzi G (2008) Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur J Nutr* 47:301–309
- Byrne AM, Foran E, Sharma R et al (2010) Bile acids modulate the Golgi membrane fission process via a protein kinase Ceta and protein kinase D-dependent pathway in colonic epithelial cells. *Carcinogenesis* 31:737–744
- Pérez-Ramos P, Olmo N, Turnay J et al (2005) Effect of bile acids on butyrate-sensitive and -resistant human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer* 53:208–219
- Olmo N, Turnay J, Lecona E et al (2007) Acquisition of resistance to butyrate induces resistance to luminal components and

- other types of stress in human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 21:254–261
18. Turnay J, Olmo N, Gavilanes JG, Benítez J, Lizarbe MA (1990) Establishment and characterization of a new human colon adenocarcinoma cell line: BCS-TC2. *Cytotechnology* 3:75–88
 19. Olmo N, Turnay J, González de Buitrago G, López de Silanes I, Gavilanes JG, Lizarbe MA (2001) Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *Eur J Biochem* 268:2113–2123
 20. López de Silanes I, Olmo N, Turnay J et al (2004) Acquisition of resistance to butyrate enhances survival after stress and induces malignancy of human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 64:4593–4600
 21. Navarro JM, Olmo N, Turnay J, Lopez-Conejo MT, Lizarbe MA (1997) Differentiation of BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells by sodium butyrate: increase in 5'-nucleotidase activity. *Eur J Clin Invest* 27:620–628
 22. Lecona E, Barrasa JI, Olmo N, Llorente B, Turnay J, Lizarbe MA (2008) Upregulation of annexin A1 expression by butyrate in human colon adenocarcinoma cells: role of p53, NF- κ B, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 28:4665–4674
 23. Guzmán-Aránguez A, Olmo N, Turnay J et al (2005) Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem* 94:178–193
 24. Weston CR, Balmanno K, Chalmers C et al (2003) Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER* represses Bim expression independently of the JNK or PI3 K pathways. *Oncogene* 22:1281–1293
 25. Kivinen K, Kallajoki M, Taimen P (2005) Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix. *Exp Cell Res* 311:62–73
 26. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V et al (1999) Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* 274:22932–22940
 27. Jin YH, Yoo KJ, Lee YH, Lee SK (2000) Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *J Biol Chem* 275:30256–30263
 28. Sayan BS, Sayan AE, Knight RA, Melino G, Cohen GM (2006) p53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria. *J Biol Chem* 281:13566–13573
 29. Lamireau T, Zoltowska M, Levy E et al (2003) Effects of bile acids on biliary epithelial cells: proliferation, cytotoxicity, and cytokine secretion. *Life Sci* 72:1401–1411
 30. Pérez MJ, Briz O (2009) Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 15:1677–1689
 31. Katona BW, Anant S, Covey DF, Stenson WF (2009) Characterization of enantiomeric bile acid-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *J Biol Chem* 284:3354–3364
 32. Powell AA, LaRue JM, Batta AK, Martinez JD (2001) Bile acid hydrophobicity is correlated with induction of apoptosis and/or growth arrest in HCT116 cells. *Biochem J* 356:481–486
 33. Payne CM, Weber C, Crowley-Skillicorn C et al (2007) Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis* 28:215–222
 34. Wachs FP, Krieg RC, Rodrigues CM et al (2005) Bile salt-induced apoptosis in human colon cancer cell lines involves the mitochondrial transmembrane potential but not the CD95 (Fas/Apo-1) receptor. *Int J Colorectal Dis* 20:103–113
 35. Yui S, Saeki T, Kanamoto R, Iwami K (2005) Characteristics of apoptosis in HCT116 colon cancer cells induced by deoxycholic acid. *J Biochem* 138:151–157
 36. Sawai H, Domae N (2008) Release of cytochrome c from mitochondria precedes Bax translocation/activation in Triton X-100-induced apoptosis. *Leuk Res* 32:445–453
 37. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ (2001) Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 33:616–626
 38. Akare S, Martinez JD (2005) Bile acid induces hydrophobicity-dependent membrane alterations. *Biochim Biophys Acta* 1735:59–67
 39. Jean-Louis S, Akare S, Ali MA, Mash EA Jr, Meuillet E, Martinez JD (2006) Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations. *J Biol Chem* 281:14948–14960
 40. Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Haussinger D (2005) Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 280:27179–27194
 41. Kirsch DG, Doseff A, Chau BN et al (1999) Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem* 274:21155–21161
 42. Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ (1999) Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ* 6:842–854
 43. Zuo Y, Xiang B, Yang J et al (2009) Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1. *Cell Res* 19:449–457
 44. Kim JS, He L, Lemasters JJ (2003) Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:463–470

4.1.2. Protección frente a la apoptosis inducida por ácidos biliares en células resistentes a butirato

El butirato, ácido graso de cadena corta presente en el lumen intestinal, además de constituir la principal fuente de energía de los colonocitos, está considerado como el principal responsable de la homeostasis del epitelio colónico debido a su capacidad para regular los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. La adquisición de resistencia a sus efectos diferenciadores y apoptóticos se ha relacionado con el proceso de carcinogénesis colorrectal. En algunas ocasiones, la adquisición de un fenotipo resistente frente a un determinado compuesto puede estar acompañada de resistencia adicional frente a diferentes tipos de estrés celular o a otros tratamientos. Por este motivo se ha estudiado el efecto del DCA y CDCA en una línea celular resistente a los efectos apoptóticos del butirato, con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la adquisición adicional de resistencia a la toxicidad inducida por ácidos biliares.

Artículo 2: Juan I. Barrasa, Angélica Santiago-Gómez, Nieves Olmo, M^a Antonia Lizarbe y Javier Turnay. “Resistance to butyrate impairs bile-acid induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via up-regulation of Bcl-2 and inactivation of Bax.”

Manuscrito enviado a publicar.

Se ha comparado la citotoxicidad del DCA y CDCA en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2. Estas últimas son resistentes a los efectos apoptóticos del butirato, y derivan de las primeras por tratamiento continuado con butirato 2 mM. Se ha comprobado que la resistencia a butirato está asociada a su vez con una supervivencia incrementada frente al tratamiento con ácidos biliares a tiempos cortos. El análisis en profundidad de los mecanismos implicados en dicha citotoxicidad en células BCS-TC2.BR2 ha puesto de manifiesto que es una consecuencia de la activación del programa apoptótico. Es más, los procesos que desencadenan la apoptosis en ambas líneas celulares son idénticos, observándose un incremento inicial en la producción de especies reactivas de oxígeno por activación de

enzimas asociadas a membrana, y la posterior transición de permeabilidad mitocondrial con la correspondiente liberación de factores proapoptóticos al citoplasma. La principal diferencia entre ambas líneas celulares reside en la expresión incrementada de Bcl-2 en las células resistentes. La activación del apoptosoma no es capaz de degradar los altos niveles de esta proteína en las células BCS-TC2.BR2, de manera que Bax permanece secuestrado e incapaz de oligomerizar para formar poros adicionales en la membrana mitocondrial. De este modo, las células resistentes eluden este ciclo de amplificación de la señal apoptótica que sí se observa en las células sensibles a butirato. Además, se ha comprobado que dicha resistencia puede revertirse empleando un inhibidor sintético de Bcl-2 que mimetiza los dominios BH3. Finalmente se ha estudiado el efecto de los ácidos biliares sobre diferentes rutas de señalización celular, observándose activación de las MAP-quinasas p38, ERK1/2 y JNK, e inhibición de Akt.

Aportación personal

La contribución personal a este trabajo abarca desde los estudios de producción de especies reactivas de oxígeno y de viabilidad en presencia o ausencia de inhibidores de enzimas de membrana, a el análisis de la activación de caspasas. También se ha participado en la evaluación de la degradación de dianas específicas mediante ensayos de *Western blot* y en la determinación de los niveles proteicos de diferentes miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2. Adicionalmente se han llevado a cabo ensayos de activación de Bax y de viabilidad en ausencia y presencia de un inhibidor de Bcl-2.

Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis

Resistance to butyrate impairs bile acid-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via up-regulation of Bcl-2 and inactivation of Bax*

Juan I. Barrasa, Angélica Santiago-Gómez, Nieves Olmo, M^a Antonia Lizarbe and Javier Turnay

From the Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040-Madrid (Spain)

*Running title: *Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis*

To whom correspondence should be addressed: Dr. Javier Turnay, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 – Madrid (Spain), Phone: +34 91 394 4148, Fax: +34 91 394 4159, e-mail: turnay@bbm1.ucm.es

Keywords: ABT-263, apoptosis, Bcl-2, bile acids, butyrate resistance, human colon adenocarcinoma

Background: Colon cancer cells that acquire resistance to butyrate lose sensitivity to other cellular stresses.

Results: Butyrate-resistant cells show decreased sensitivity to bile acid-induced apoptosis.

Conclusion: Resistance to bile acid-induced apoptosis is mediated by overexpression of Bcl-2 in butyrate-resistant cells.

Significance: The use of Bcl-2 inhibitors, as ABT-263, could revert resistance of colon tumor cells to chemotherapeutic drugs.

A critical risk factor in colorectal carcinogenesis and tumor therapy is the resistance to the apoptotic effects of different compounds from the intestinal lumen, among them butyrate (main regulator of colonic epithelium homeostasis). Insensitivity to butyrate-induced apoptosis yield resistance to other agents, as bile acids or chemotherapy drugs, allowing the selective growth of malignant cell subpopulations. Here we analyze bile acid-induced apoptosis in a butyrate-resistant human colon adenocarcinoma cell line (BCS-TC2.BR2) to determine the mechanisms that underlay the resistance to these agents in comparison with their parental butyrate-sensitive BCS-TC2 cells. This study demonstrates that DCA and CDCA still induce apoptosis in butyrate-resistant cells through increased ROS production by activation of membrane-associated enzymes and subsequent triggering of the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway. Although this mechanism is similar to that described in butyrate-sensitive cells, cell viability is significantly higher in resistant cells. Moreover, butyrate-resistant

cells show higher Bcl-2 levels that confer resistance to bile acid-induced apoptosis sequestering Bax and avoiding Bax-dependent pore formation in the mitochondria. We have confirmed that this resistance is reverted using the Bcl-2 inhibitor ABT-263, thus demonstrating that the lower sensitivity of butyrate-resistant cells to the apoptotic effects of bile acids is mainly due to increased Bcl-2 levels.

The homeostasis of the colonic epithelium is tightly regulated by different compounds present in the intestinal lumen. The most relevant is butyrate, derived from the anaerobic fermentation of diet-fiber by the colonic bacterial flora. Butyrate not only constitutes the main energy source for colonocytes but it is also a well-known endogenous histone deacetylase inhibitor. This activity leads to changes in the gene expression profile orchestrating the renewal process of the colonic epithelium (1,2). The proliferation and differentiation program followed by colonocytes depends on the characteristic structure of the colon crypts and on the accessibility of luminal compounds to the cells. Colonocytes present a higher differentiation state at the top of the crypts whereas undifferentiated stem cells are localized at the bottom (3). The exposition to low butyrate concentration at the bottom of the crypts is thought to stimulate proliferation of stem cells (4) maintaining a low differentiation state. In contrast, cells at the top of the crypt are exposed to high concentrations of butyrate, that activate their differentiation program finally triggering apoptosis and allowing the renewal of the intestinal mucosa (5). However, if certain colon cells acquire

Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis

resistance to butyrate or other luminal compounds, they may survive apoptosis and potentially progress towards malignancy (6,7).

Bile acids are amphipathic molecules that allow lipids to be absorbed in physiological conditions, but they have also been proposed as potentially dangerous in individuals with different pathologies or with a fat-rich diet, where their concentrations are elevated (8). Bile acids can promote DNA damage triggering apoptosis, as described in hepatocytes and different colon-cancer cell lines (9,10). Moreover, cells with unrepaired DNA damage may accumulate mutations leading to gastrointestinal cancer due to their resistance to apoptosis (7,11). Thus, it is essential to understand not only how bile acids exert their cytotoxic activity, but also the molecular mechanisms responsible for the acquisition of resistance to apoptosis. We have previously described the induction of apoptosis by deoxycholic (DCA) and chenodeoxycholic (CDCA) acids by oxidative stress in human colon adenocarcinoma BCS-TC2 cells which are sensitive to differentiation and apoptosis induced by butyrate (12). Activation of different membrane-associated enzymes [mainly NAD(P)H oxidases] leads to an increase of reactive oxygen species (ROS) that eventually triggers the mitochondrial apoptotic pathway. The activation of caspase-3 by the apoptosome activates Bax by degradation of Bcl-2, thus generating a feedback loop that amplifies the apoptotic signal.

Here we have studied the cytotoxic effect of bile acids in BCS-TC2.BR2 colon adenocarcinoma cells which are resistant to butyrate-induced apoptosis (13) and also to other types of stress including the cytotoxic effect of bile acids (14,15). We have observed that the mechanism of apoptosis triggered by bile acids in butyrate-resistant cells is similar to that observed in butyrate-sensitive cells (oxidative stress). However, BCS-TC2.BR2 cells express higher levels of antiapoptotic proteins, mainly Bcl-2, that prevent the activation of Bax. Thus, resistant cells do not show the feedback loop present in parental cells, increasing their survival to bile acid-induced apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Materials – Bile acids (CA, CDCA and DCA), *N*-acetyl-cysteine (NAC), cisplatin, *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-methyl) fluoromethylketone (Z-VAD-FMK), rhodamine-

123, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), propidium iodide and protein G-Sepharose beads were from Sigma (Alcobendas, Spain). The NAD(P)H oxidase activity inhibitors apocynin and diphenyleneiodonium (DPI) as well as the phospholipase A₂ (PLA₂) inhibitor quinacrine were from Merck (Darmstadt, Germany). The Bcl-2 inhibitor ABT-263 (navitoclax) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antibodies are described in the corresponding figure legends. All other chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma or Merck.

Cell culture, bile acid treatments and cell viability – The establishment and characterization of BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells have been previously described (13,16). These cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, containing 4.5 g/l glucose, and supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum, penicillin (50 IU/ml), streptomycin (50 µg/ml) and glutamine (300 µg/ml). BCS-TC2.BR2 cells were maintained in standard growth medium in the presence of 2 mM butyrate. Routinely, cells were cultured at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. The culture medium was replaced every three days and cells were routinely weekly subcultured by trypsinization.

Stock solutions of bile acids were prepared at 100 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO) and maintained at -20°C. Aliquots were added to the supplemented culture medium to obtain the appropriate final concentration of bile acid and at final DMSO concentration of 0.5% (v/v). Cell treatments were always carried out on subconfluent cultures. Cells were seeded at 3-6x10⁴ cells/cm² in supplemented culture medium and were allowed to attach and grow for 2 days before the addition of fresh culture medium containing the corresponding bile acid. Cells were then incubated under these conditions during the required periods of time.

Cell viability was determined using an adenosine triphosphate (ATP)-bioluminescence assay (CellTiter-Glo, Promega, L'Hospitalet de Llobregat, Spain). Luminescence was measured in a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold, Germany).

Flow cytometry analysis – For flow cytometry, 10⁶ cells resuspended in 10 mM Hepes, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1.8 mM CaCl₂, were incubated for 15 min at room temperature in the presence of

Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis

0.005% propidium iodide and either 2 µg/ml annexin A5-FITC (obtained and labeled in our laboratory (17)) or 1 µg/ml rhodamine-123. Analyses were performed in a FACScan cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA), as previously reported (12).

Fluorimetric determination of reactive oxygen species – Cells were seeded in 96-well plates and incubated for 2 h in the presence of 500 µM DCA or CDCA followed by addition of 10 µM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) to quantify ROS generation. After 15 min incubation at 37°C, oxidized DCFH fluorescence was measured in a Fluostar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

In order to check the effect of NAD(P)H oxidases and PLA₂ inhibitors on ROS production, a 2 h preincubation with these inhibitors or with the ROS scavenger NAC (*N*-acetyl-cysteine) was carried out; afterwards, the medium was removed and cells were further incubated 2 h with 500 µM DCA before measuring ROS.

Western blot analysis – Equal amounts of protein from cell homogenates were resolved by SDS-PAGE after heat denaturing in the presence of 5% β-mercaptoethanol. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and analyzed by Western blot as described elsewhere (18). Development was performed using the "Amersham ECL Western blot system" (GE Healthcare, Barcelona, Spain), and chemiluminescence was detected in a LAS-3000 mini image capture system from Fujifilm. Densitometric analysis was performed obtaining volumograms using Quantity One v4.6.6 (Bio-Rad). Protein content was determined in quadruplicate samples using the D_c Protein Assay (Bio-Rad).

Analysis of conformational changes in Bax – Cells (two dishes of 10 cm diameter per sample) were left untreated or subjected to 1 h treatment with 500 µM DCA or CDCA [without or after preincubation for 30 min with 50 µM Z-VAD-FMK (pan-caspase inhibitor)], or 100 µM cisplatin (24 h), and then lysed in CHAPS lysis buffer (1% CHAPS, 10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 µM leupeptin, 10 µg/ml aprotinin) to preserve the conformation of Bax, as previously described (19). For positive control, cells were lysed in Triton X-100-containing buffer (1% Triton X-100, 20 mM

Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% glycerol, and protease inhibitors) to fully expose the N-20 epitope. These lysates were either used as whole cell extracts or for immunoprecipitation using protein G-Sepharose beads, as described (12).

Statistical analysis – The normal distribution of data was determined by the Kolmogorov-Smirnov test. ANOVA analyses and Student's *t*-tests (two-tailed) were carried out using SigmaPlot v11.2 (Systat Software, Erkrath, Germany). Statistical significance was considered to be achieved at the *p*<0.05 level.

RESULTS

Effect of DCA and CDCA on cell viability, apoptosis and mitochondrial membrane potential – Cell viability was analyzed by measuring ATP content after treatment with DCA and CDCA for different periods of time (Fig. 1A). No significant changes in cell viability were induced after treatment with cholic acid (CA) up to 500 µM. DCA and CDCA reduced cell viability in a time- and concentration-dependent manner in both cell lines, being the effect of CDCA significantly higher (*p*<0.01). The cytotoxic effect of both bile acids was stronger in the parental cells compared to that observed in the resistant ones. After 2 h treatment, cell viability in BCS-TC2 cells decreased 34% with 500 µM DCA and 50% with 500 µM CDCA, while BCS-TC2.BR2 cells suffered only a 19% or 30% reduction in cell viability with 500 µM DCA or CDCA, respectively. Moreover, the decrease was observed at shorter incubation times in BCS-TC2 cells (~15 min) compared to resistant cells (~30-60 min). ATP depletion was parallel to an increase in the number of detached cells (data not shown).

Induction of apoptosis was analyzed by measuring externalization of phosphatidylserine in the plasma membrane by flow cytometry (Fig. 1B). In BCS-TC2 cells, the percentage of apoptotic cells increased drastically after CDCA treatment (41%) and to a lower extent with DCA (38%), being this effect lower for BCS-TC2.BR2 cells (22% and 17%, respectively).

We have also evaluated the alterations in the mitochondrial membrane potential of both cell lines after 2 h treatment with 500 µM CDCA using rhodamine-123 (Fig. 1C). CDCA induced a significant decrease in the mitochondrial membrane potential; BCS-TC2 cells clearly showed the appearance of a new cell population

Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis

whereas only a slight increase in this population was detected in resistant cells.

Bile acid-induced ROS generation – We have previously described that DCA and CDCA increase ROS generation in BCS-TC2 cells as a consequence of the activation of several membrane-associated enzymes (12). Thus, we have analyzed ROS production in BCS-TC2.BR2 cells and the effect of NAC as well as specific inhibitors of NAD(P)H oxidases (apocynin and DPI) and PLA₂ (quinacrine) in both ROS (Fig. 2A) and ATP levels (Fig. 2B). Preincubation with the inhibitors alone did not significantly alter ($p>0.05$) ROS or ATP levels (data not shown). Incubation of BCS-TC2.BR2 cells with 500 μ M DCA or CDCA for 2 h induced an increase in ROS production (slightly higher for CDCA) that was not detected in the presence of NAC. Interestingly, apocynin, DPI and quinacrine also blocked ROS generation, which was reflected in a protection against ATP depletion.

Effect of bile acids in levels of different apoptosis-related proteins and Bax activation – Caspase activation in BCS-TC2.BR2 cells was analyzed by Western blot after treatment with DCA and CDCA using butyrate-sensitive cells as control (Fig. 3A). In BCS-TC2 cells CDCA triggered the activation of caspase-9 with subsequent activation of caspase-3 and cleavage of PARP. Regarding BCS-TC2.BR2 cells, activation of both caspases and PARP cleavage were also observed, but only at the highest concentration (500 μ M), being this effect clearly stronger in the parental cells. No significant changes were observed in the protein levels of the transcription factor NF- κ B whereas a slight decrease was detected in p53 in BCS-TC2.BR2 extracts. BCS-TC2 cells showed lower basal expression of p53 (~50%) showing a 40% decrease after CDCA treatment.

Concerning the proapoptotic members of the Bcl-2 protein family, we have not detected significant changes in Bax levels (Fig. 3A). Bid levels decreased after treatment with 500 μ M CDCA in both cell lines (40-45%), but the tBid fragment only faintly appeared in the parental cells. This is probably due to an unspecific cleavage by activated effector caspases, as we have not detected caspase-8 activation. Among the three Bim isoforms, we have not observed changes in the extra-long and long isoforms in BCS-TC2.BR2 cells after bile acid treatment, although there was a 35% decrease in the extra-long

isoform in BCS-TC2 cells after CDCA treatment ($p<0.05$). The short isoform showed only a small gradual increase in BCS-TC2.BR2 cells after DCA treatment (~1.4-fold at 500 μ M; $p<0.05$).

We also analyzed the antiapoptotic members of the Bcl-2 family. No significant variations were detected in Bcl-xL protein levels. However, a different behavior between both cell lines was observed in Bcl-2 and, to a lower extent, in Mcl-1. Parental cells showed lower Mcl-1 basal protein levels compared to resistant cells (19%; $p<0.05$) with a reduction of 35% after CDCA treatment ($p<0.01$) that was not observed in BCS-TC2.BR2 cells. More evident were the differences between basal protein levels of Bcl-2, that were quite higher in the resistant cells (3.5-fold; $p<0.01$) compared to the parental ones. Bile acid treatments did not alter these levels in BCS-TC2.BR2 cells, while induced a severe decrease in the parental cells (81%; $p<0.01$).

Taking into account the differences in the protein levels of antiapoptotic members of the Bcl-2 family, we checked total levels and activation of Bax in BCS-TC2.BR2 cells in different conditions (Fig. 3B). Bax activation was observed in the positive control using cisplatin or in the lysate obtained in the presence of Triton X-100, but not after DCA treatment; only a slight activation was detected after CDCA treatment which was abolished by preincubation with the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK, as we have also previously observed in BCS-TC2 cells (12). On the other hand, total levels of Bax and Bcl-2 remained mainly unaltered with the different treatments.

Inhibition of Bcl-2 activity by ABT-263: effects on viability and Bax activation – Considering that one of the most interesting differences between parental and resistant cells was the disparity in Bcl-2 protein levels, we first analyzed the effect of the Bcl-2 inhibitor ABT-263 in the cytotoxicity of bile acids in both cell lines (Fig. 4A). ABT-263 alone did not significantly modify cell viability. On the other hand, the combined treatment with bile acids and ABT-263 produced a synergistic effect in bile acid-dependent ATP depletion at any of the evaluated concentrations. BCS-TC2.BR2 cells were more affected by Bcl-2 inhibition with an almost complete loss of resistance to bile acids showing ATP levels similar to those in butyrate-sensitive cells.

As Bcl-2 exerts its antiapoptotic activity by blocking the oligomerization of Bax, we checked

if the combined treatment with bile acids and ABT-263 turned into an increased Bax activation (Fig. 4B). Incubation with ABT-263 alone promoted a slight activation of Bax in both cell lines without changes in Bax or Bcl-2 total protein levels. CDCA treatment alone yielded a significant activation of Bax together with a strong decrease in Bcl-2 levels in parental cells. Under these conditions, Bax activation in BCS-TC2.BR2 cells was almost undetectable with only a slight decrease in Bcl-2 levels. Interestingly, combined treatment with ABT-263 and CDCA showed a synergistic effect that turned into an increased Bax activation in both cell lines (3- and 10-fold in BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2, respectively; $p < 0.01$) without significant changes in Bcl-2 levels.

Effect of bile acids in cell signaling pathways – We analyzed the effects of bile acid treatments in the activation of several kinases by Western blot (Fig. 5A). Regarding MAPKs, we did not find significant changes in total levels of ERK1/2 and p38. JNK levels were very low in both cell lines, but resistant cells showed higher expression than parental cells with a reduction after DCA and CDCA treatments. On the other hand, we detected an increase in phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK in both cell lines. In BCS-TC2.BR2, phospho-ERK1/2 increased 3.5- and 4-fold upon treatment with 500 μ M DCA and 250 μ M CDCA, respectively; phospho-p38 increased 2.4-fold at 500 μ M DCA and CDCA (Fig. 5B). Interestingly, parental cells showed an increased ERK1/2 basal phosphorylated state (3.4-fold; $p < 0.01$) compared to resistant cells.

Akt presented a different behavior upon incubation with bile acids. Whereas no significant differences were observed in Akt total levels in BCS-TC2.BR2 cells, a decrease around 50% ($p < 0.01$) was detected in parental cells after CDCA treatment (Fig. 5A). In addition, and opposite to MAPKs, bile acid promoted a reduction in Akt phosphorylation in butyrate-resistant cells that was not observed in the parental ones (Fig. 5B).

DISCUSSION

Colorectal cancer is one of the most common causes of cancer death in the world, with more than 600,000 annual deaths (20). Understanding how cells are able to acquire chemoresistance to different compounds is not only essential to improve our knowledge about the induction and

development of tumors, but also for the design of new therapeutic strategies. On this idea, the establishment of cell lines with acquired resistance to colonic luminal agents involved in the renewal of the colon epithelium yields an essential tool for these studies. Regrettably, only a few models have been developed for butyrate (13,21,22) and DCA (23) resistance. Here we take advantage of a cell system in which butyrate-sensitive and resistant cells can be compared to dissect their molecular differences regarding bile acid-triggered apoptosis and the signaling pathways involved. BCS-TC2.BR2 cells are not only resistant to the apoptotic effects of butyrate but also to other different stresses such as heat shock or glucose deprivation (14). Moreover, butyrate-resistant cells also show an enhanced survival to the cytotoxic effects of bile acids compared to the parental cell line (15). We have previously described that bile acids trigger the intrinsic apoptotic pathway in BCS-TC2 butyrate-sensitive cells via oxidative stress by activation of membrane-associated NAD(P)H oxidases and PLA₂ (12).

We have analyzed the cytotoxic effects of DCA and CDCA at short treatment time (2 h) in both butyrate-sensitive and resistant cells. BCS-TC2.BR2 cells are still sensitive to bile acid-induced cytotoxicity although to a significantly lower extent than BCS-TC2 cells. Apoptosis is also triggered by an enhancement in ROS production, greater with CDCA probably due to its higher hydrophobicity, which finally leads to an impairment of mitochondrial functionality followed by caspase activation. This fact has been confirmed using specific inhibitors for NAD(P)H oxidases and PLA₂, which reduced intracellular ROS levels with a subsequent recovery in cell viability. Taking into account that bile acids trigger apoptosis in both cell lines through a similar mechanism, the question that arises is: what is the difference between butyrate-sensitive and resistant cells, which confers the enhanced survival of the latter to bile acid-induced apoptosis?

We have previously described that bile acid-induced apoptosis in BCS-TC2 cells eventually leads to the activation of effector caspase-3 via apoptosome, which promotes the degradation of Bcl-2, thus releasing Bax from the Bcl-2/Bax complexes. Then Bax is able to oligomerize and form mitochondrial pores that enhance the release of proapoptotic factors to the cytosol, acting as a proapoptotic feedback loop (Fig. 6A) (12). Here,

Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis

we have confirmed by Western blot the activation of caspases 9 and 3 after bile acid treatment not only in BCS-TC2 cells but also in BCS-TC2.BR2 cells, being this effect quite stronger in the former as expected. The decreased caspase activity in BCS-TC2.BR2 cells is reflected in a lower cleavage of apoptotic targets, as PARP or p53. On this regard, it has been described that p53 fragments arising from caspase degradation may contribute to an enhancement of apoptosis via mitochondrial membrane depolarization (24). Thus, the reduced p53 cleavage in BCS-TC2.BR2 cells could contribute to their enhanced resistance to bile acid-induced apoptosis. Regarding proapoptotic proteins, levels of Bax remain mainly unaltered after bile acid treatments suggesting that the apoptotic effects of this protein occur through modulation of its activity.

More interestingly, we have observed clear differences in protein levels of different antiapoptotic members of the Bcl-2 family between butyrate-sensitive and resistant cells. Thus, while Bcl-xL seems to be unaltered after treatments and shows equivalent levels between both cell lines, Bcl-2, and to a lower extent Mcl-1, are overexpressed in BCS-TC2.BR2 cells and are not modified by bile acid treatments. On the other hand, BCS-TC2 cells show a clear reduction in Bcl-2 levels after CDCA treatment, as we have previously described (12), together with a slight decrease in Mcl-1. These results could explain the apoptosis resistance of BCS-TC2.BR2 cells due to high levels of the antiapoptotic protein Bcl-2, which sequesters Bax avoiding its oligomerization in the mitochondrial membrane. In this regard, Bax activation assays confirmed that resistant cells show only a slight Bax activation after CDCA treatment (not detected with DCA), compared to the strong activation observed in sensitive cells.

To confirm this hypothesis, we decided to use the Bcl-2 inhibitor ABT-263, a small molecule that mimetizes the BH3 domain of Bcl-2 protein family members. Thus, it is able to bind to the groove of different antiapoptotic members, blocking their ability to interact with their physiological partners. ABT-263 shows high affinity towards Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w, but low affinity for Mcl-1 (25). Bax activation assays in the presence of ABT-263 confirmed that Bcl-2 is responsible for the low Bax activation levels in BCS-TC2.BR2 cells, as we observed a synergistic effect between CDCA and ABT-263. This effect correlates with a reduction in cell viability after

treatment with bile acids in combination with ABT-263. Moreover, under these conditions, almost no differences were found between BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells. Thus, the correlation between inhibition of Bcl-2, increased Bax activation and decreased viability strongly suggests that the high levels of Bcl-2 are responsible for the resistance against bile acid-induced apoptosis in BCS-TC2.BR2 cells (Fig. 6B). In this regard, it has been previously described that DCA-resistant cells derived from the HCT-116 cells overexpress Bcl-2 (23), and that overexpression of Bcl-2 by transfection of HCT-116 cells suppresses DCA-induced apoptosis (26).

We have also observed activation of different signaling pathways after DCA and CDCA treatments: increased phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK. The activation of these MAPKs could be explained as a defensive response of the cell, trying to overcome the apoptotic effects of these agents. In fact, the strongest activation of these kinases is achieved with those treatments that induce the highest cytotoxicity. In addition, resistant cells exhibit a stronger survival response. Stimulation of these MAPK pathways after bile acid treatment has been previously observed in different colon cancer cell lines. Thus, DCA induces ERK activation in HCT-116, Caco-2, H508 and SNU-C4 cells through different mechanisms (27,28). Moreover, bile acids induce an increase in ROS production in Caco-2 cells via activation of PLA₂, NADH dehydrogenase and xanthine oxidase that, in turn, promote the phosphorylation of p38 and ERK1/2 (29). Activation of p38 and ERK in DCA-treated HCT-116 cells has been suggested as a prosurvival signal against the proapoptotic effects of bile acids (30). A similar protective effect has been described for JNK activation, but mainly in hepatocytes, via regulation of several apoptosis-related proteins (31).

Regarding Akt, we have observed a reduction in the phosphorylation state after bile acid treatments that mainly affected butyrate-resistant cells, whereas in BCS-TC2 cells a decrease in total Akt levels was observed. Similar results have been recently observed in several cell lines after induction of oxidative stress by different agents; Akt phosphorylation decreases contributing to apoptosis induction (32,33). Even more, ROS-induced suppression of Akt pathway may be

Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis

accompanied by MAPKs activation in a similar pattern to that observed in our cell system (34,35).

Taking into account all these results we suggest that BCS-TC2.BR2 cells show resistance to bile acid-induced apoptosis due to an overexpression of Bcl-2 that overcomes the pro-apoptotic feedback loop observed in BCS-TC2 cells. After activation of the intrinsic apoptotic program by oxidative stress, caspase-3 is not able to degrade enough Bcl-2 protein to allow the release of Bax, the formation of Bax-dependent pores in the mitochondrial membrane and the subsequent release of proapoptotic factors. Here we demonstrate that resistance can be reverted *in vitro* by the use of the Bcl-2 inhibitor ABT-263. This

suggests that acquisition of resistance to several compounds used in colorectal carcinoma treatments, such as the clinically used derivatives of butyrate or other HDAC inhibitors (36), could be potentially reverted by oral coadministration with the Bcl-2 inhibitor ABT-263 in tumors where elevated levels of this protein are detected.

Acknowledgements –We thank the staff from the Microscopy and Flow Cytometry Center from the Complutense University of Madrid for their skillful assistance. This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), Spain [grant number BFU2008-04758].

REFERENCES

1. Davie, J. R. (2003) *J Nutr* **133**, 2485S-2493S
2. Vanhoutvin, S. A., Troost, F. J., Hamer, H. M., Lindsey, P. J., Koek, G. H., Jonkers, D. M., Kodde, A., Venema, K., and Brummer, R. J. (2009) *PLoS One* **4**, e6759
3. Yeung, T. M., Chia, L. A., Kosinski, C. M., and Kuo, C. J. (2011) *Cell Mol Life Sci* **68**, 2513-2523
4. Scheppach, W., Bartram, H. P., and Richter, F. (1995) *Eur J Cancer* **31A**, 1077-1080
5. Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J., and Brummer, R. J. (2008) *Aliment Pharmacol Ther* **27**, 104-119
6. Serpa, J., Caiado, F., Carvalho, T., Torre, C., Goncalves, L. G., Casalou, C., Lamosa, P., Rodrigues, M., Zhu, Z., Lam, E. W., and Dias, S. (2010) *J Biol Chem* **285**, 39211-39223
7. Powell, A. A., Akare, S., Qi, W., Herzer, P., Jean-Louis, S., Feldman, R. A., and Martinez, J. D. (2006) *BMC Cancer* **6**, 219
8. Bernstein, C., Holubec, H., Bhattacharyya, A. K., Nguyen, H., Payne, C. M., Zaitlin, B., and Bernstein, H. (2011) *Arch Toxicol* **85**, 863-871
9. Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Pelli, M. A., and Morozzi, G. (2008) *Eur J Nutr* **47**, 301-309
10. Bernstein, C., Bernstein, H., Garewal, H., Dinning, P., Jabi, R., Sampliner, R. E., McCuskey, M. K., Panda, M., Roe, D. J., L'Heureux, L., and Payne, C. (1999) *Cancer Res* **59**, 2353-2357
11. Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C. M., and Dvorak, K. (2009) *World J Gastroenterol* **15**, 3329-3340
12. Barrasa, J. I., Olmo, N., Pérez-Ramos, P., Santiago-Gómez, A., Lecona, E., Turnay, J., and Lizarbe, M. A. (2011) *Apoptosis* **16**, 1054-1067
13. López de Silanes, I., Olmo, N., Turnay, J., González de Buitrago, G., Pérez-Ramos, P., Guzmán-Aránguez, A., García-Díez, M., Lecona, E., Gorospe, M., and Lizarbe, M. A. (2004) *Cancer Res* **64**, 4593-4600
14. Olmo, N., Turnay, J., Lecona, E., García-Díez, M., Llorente, B., Santiago-Gómez, A., and Lizarbe, M. A. (2007) *Toxicol In Vitro* **21**, 254-261
15. Pérez-Ramos, P., Olmo, N., Turnay, J., Lecona, E., de Buitrago, G. G., Portolés, M. T., and Lizarbe, M. A. (2005) *Nutr Cancer* **53**, 208-219
16. Turnay, J., Olmo, N., Gavilanes, J. G., Benítez, J., and Lizarbe, M. A. (1990) *Cytotechnology* **3**, 75-88
17. Olmo, N., Turnay, J., González de Buitrago, G., López de Silanes, I., Gavilanes, J. G., and Lizarbe, M. A. (2001) *Eur J Biochem* **268**, 2113-2123
18. Guzmán-Aránguez, A., Olmo, N., Turnay, J., Lecona, E., Pérez-Ramos, P., López de Silanes, I., and Lizarbe, M. A. (2005) *J Cell Biochem* **94**, 178-193

Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis

19. Weston, C. R., Balmanno, K., Chalmers, C., Hadfield, K., Molton, S. A., Ley, R., Wagner, E. F., and Cook, S. J. (2003) *Oncogene* **22**, 1281-1293
20. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011) *CA Cancer J Clin* **61**, 69-90
21. Fung, K. Y., Brierley, G. V., Henderson, S., Hoffmann, P., McColl, S. R., Lockett, T., Head, R., and Cosgrove, L. (2011) *J Proteome Res* **10**, 1860-1869
22. Fung, K. Y., Lewanowitsch, T., Henderson, S. T., Priebe, I., Hoffmann, P., McColl, S. R., Lockett, T., Head, R., and Cosgrove, L. J. (2009) *J Proteome Res* **8**, 1220-1227
23. Crowley-Weber, C. L., Payne, C. M., Gleason-Guzman, M., Watts, G. S., Futscher, B., Waltmire, C. N., Crowley, C., Dvorakova, K., Bernstein, C., Craven, M., Garewal, H., and Bernstein, H. (2002) *Carcinogenesis* **23**, 2063-2080
24. Sayan, B. S., Sayan, A. E., Knight, R. A., Melino, G., and Cohen, G. M. (2006) *J Biol Chem* **281**, 13566-13573
25. Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S. H., and Elmore, S. W. (2008) *Cancer Res* **68**, 3421-3428
26. LaRue, J. M., Stratagoules, E. D., and Martinez, J. D. (2000) *Cancer Lett* **152**, 107-113
27. Akare, S., and Martinez, J. D. (2005) *Biochim Biophys Acta* **1735**, 59-67
28. Cheng, K., and Raufman, J. P. (2005) *Biochem Pharmacol* **70**, 1035-1047
29. Araki, Y., Katoh, T., Ogawa, A., Bamba, S., Andoh, A., Koyama, S., Fujiyama, Y., and Bamba, T. (2005) *Free Radic Biol Med* **39**, 769-780
30. Qiao, D., Stratagoules, E. D., and Martinez, J. D. (2001) *Carcinogenesis* **22**, 35-41
31. Qiao, L., Han, S. I., Fang, Y., Park, J. S., Gupta, S., Gilfor, D., Amorino, G., Valerie, K., Sealy, L., Engelhardt, J. F., Grant, S., Hylemon, P. B., and Dent, P. (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 3052-3066
32. Redlak, M. J., and Miller, T. A. (2011) *Dig Dis Sci* **56**, 323-329
33. Luo, H., Yang, Y., Huang, F., Li, F., Jiang, Q., Shi, K., and Xu, C. (2012) *Cancer Lett* **315**, 78-85
34. Kim, K. S., Choi, H. W., Yoon, H. E., and Kim, I. Y. (2010) *J Biol Chem* **285**, 40294-40302
35. Park, K. R., Nam, D., Yun, H. M., Lee, S. G., Jang, H. J., Sethi, G., Cho, S. K., and Ahn, K. S. (2011) *Cancer Lett* **312**, 178-188
36. Ma, X., Ezzeldin, H. H., and Diasio, R. B. (2009) *Drugs* **69**, 1911-1934

FOOTNOTES

The abbreviations used are: CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; DCA, deoxycholic acid; DCFH-DA, rhodamine-123, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DMSO, dimethyl sulfoxide; DPI, diphenyleneiodonium; ERK, extracellular signal-regulated kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NAC, N-acety-cysteine; PLA₂, phospholipase A₂; ROS, reactive oxygen species; Z-VAD-FMK, N-benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-methyl) fluoromethylketone

FIGURE LEGENDS**FIGURE 1. Effect of bile acids on cell viability, apoptosis and mitochondrial membrane potential.**

(A) Cells were seeded into 96-well plates at $1-2 \times 10^4$ cells/well in supplemented medium and were cultured for 2 days. Afterwards, medium was removed and changed for fresh one containing the corresponding bile acid and cell viability was analyzed after the indicated incubation time by measuring ATP content using a luminometric assay as described in Materials and methods. Data are normalized versus control cultures and represent mean values (\pm S.D.) from three independent experiments with quadruplicate samples. ANOVA analyses reveal significant differences between DCA and CDCA treatments in BCS-TC2 cells at the three concentrations used (only at 250 and 500 μ M in BCS-TC2.BR2 cells) as well as in comparisons between both cell lines at the same concentrations of bile acids. **(B)** Apoptosis was determined after treatment for 2 h with 500 μ M CA, DCA or CDCA. Cells were then collected by trypsinization and stained with propidium iodide and FITC-annexin A5 and the percentage of apoptosis was determined by flow cytometry from the annexin A5-positive cells. Data represent mean

Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis

values (\pm S.D.) from three independent experiments (*, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$; apoptosis in bile acid-treated cells vs. controls). **(C)** Mitochondrial membrane potential was analyzed after incubation with 500 μ M CDCA for 2 h. After addition of rhodamine-123 and propidium iodide, cells were analyzed by flow cytometry. Representative histograms and total MFIs from three independent experiments are shown.

FIGURE 2. Influence of inhibitors of ROS production in bile acid-induced oxidative stress and viability of BCS-TC2.BR2 cells. **(A)** ROS production was determined by a fluorimetric assay measuring DCFH oxidation on 96-well plates after a 2 h pretreatment of exponentially growing BCS-TC2.BR2 cells in the absence or in the presence of 20 mM NAC, 100 μ M apocynin, 50 μ M DPI or 5 μ M quinacrine (concentrations with maximum inhibitory activity without inducing cytotoxicity), followed by a further 2 h treatment with 500 μ M DCA or CDCA. Control cultures containing only vehicle were used to normalize DCFH fluorescence. **(B)** Viability was determined by measuring ATP content in parallel cultures to those in (A) and normalized versus control cultures. Data in (A) and (B) represent mean values (\pm S.D.) from two independent experiments with quadruplicate samples (**, $p < 0.01$; comparisons vs. controls with neither inhibitors nor bile acid treatment).

FIGURE 3. Expression of apoptosis-related proteins and Bax activation in BCS-TC2.BR2 cells treated with DCA or CDCA. **(A)** Protein extracts were obtained by solubilization of the monolayers in 10 mM Tris, pH 8.0, containing 140 mM NaCl, 2% (v/v) Triton X-100 and protease and phosphatase inhibitors (1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 nM pepstatin A, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 mM β -glycerophosphate and 1 mM dithiothreitol). Western blots showing activation of caspases-9 and -3 (arrows show fragments corresponding to proteolytic activation of pro-caspases-9 and -3), cleavage of PARP, and levels of transcription factors NF- κ B and p53, and several pro- and anti-apoptotic proteins. Samples correspond to total cell extracts obtained after 2 h treatment of BCS-TC2.BR2 cells with different concentrations of DCA or CDCA, and BCS-TC2 cells in the presence or absence of 500 μ M CDCA. **(B)** Activation of Bax was detected by immunoprecipitation of activated Bax using the N-20 polyclonal antibody as described in Materials and methods. Cells were incubated with 500 μ M DCA or CDCA for 2 h with or without a 30 min preincubation with 50 μ M Z-VAD-FMK (+Z-VAD). Cisplatin incubation (CisPt; 100 μ M, 24 h) was also carried out as a control of apoptosis. Triton extraction was used as control of active-Bax immunoprecipitation due to the exposure of the epitope recognized by the N-20 antibody with this detergent. Total Bax and Bcl-2 were detected by Western blot of whole cell extracts. Vinculin levels are shown as protein loading controls and were used to normalize densitometric determinations. Blots from (A) and (B) are representative of three to six different experiments. Antibodies used: mouse monoclonal antibodies against human p53 (Ab-6, clone DO-1, Thermo Scientific, Alcobendas, Spain), poly(ADP-ribose) polymerase (PARP, Labclinics, Barcelona, Spain), vinculin (hVIN1, Sigma) and Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology); rabbit polyclonal antibodies against NF- κ B (p50, H-119), activated Bax (N-20) (both from Santa Cruz Biotechnology), Mcl-1, Bcl-xL, Bim, Bid, caspase-3 and caspase-9 (from Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

FIGURE 4. Effect of the Bcl-2 inhibitor ABT-263 on cell viability and Bax activation after bile acid treatments. **(A)** Cell viability was determined measuring ATP content after 2 h preincubation of BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cultures with 3 μ M ABT-263 followed by further 2 h exposure to the indicated concentrations of DCA or CDCA. Data are normalized versus control cultures containing only vehicle and represent mean values (\pm S.D.) from three independent experiments with quadruplicate samples. ANOVA analysis reveals significant differences in the DCA and CDCA concentration dependent effect between BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells in the absence of ABT-263 inhibitor, but there are no significant differences when cells were pretreated with ABT-263. **(B)** Activation of Bax was detected by immunoprecipitation as described in Fig. 3. Cells were preincubated for 2 h in the presence or absence of 3 μ M ABT-263, and further incubated in the absence or presence of 500 μ M CDCA for additional 2 h. Total Bax and Bcl-2 were detected by Western blot of whole cell extracts; vinculin levels are shown as protein loading controls and were used to normalize densitometric determinations. Blots are representative of four different experiments. Antibodies used are indicated in Fig. 3.

Butyrate resistance impairs bile acid-induced apoptosis

FIGURE 5. Effect of bile acids in cell signaling pathways. (A) Western blots showing total and phosphorylated levels of ERK1/2, p38, JNK and Akt are shown. Samples correspond to whole cell extracts obtained after 2 h treatment of BCS-TC2.BR2 cells with different concentrations of DCA and CDCA, and BCS-TC2 cells in the presence or absence of 500 μ M CDCA. Vinculin levels are shown as protein loading controls and were used to normalize densitometric determinations. Blots are representative of four different experiments. (B) Densitometric analysis of the phosphorylation degree of ERK1/2, p38 and Akt obtained from Western blots in (A). The phosphorylation degrees are normalized versus the corresponding values from control cultures of BCS-TC2.BR2 and BCS-TC2 cells. Data correspond to mean values (\pm S.D.) from unsaturated blots from four different experiments (*, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$; comparisons vs. corresponding controls). Antibodies used: rabbit polyclonal antibodies against p38-MAPK, ERK1/2 (p44/42), SAPK/JNK, Akt, phospho-p38 (Thr180/Tyr182), phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) and phospho-Akt (Ser473; 193H12) (all from Cell Signaling).

FIGURE 6. Proposed mechanism of resistance to bile acid-induced apoptosis in BCS-TC2.BR2 cells. As we have previously described, the main triggering factor for DCA- and CDCA-induced apoptosis in BCS-TC2 cells is ROS production by activation of membrane associated enzymes NAD(P)H oxidases and PLA₂ (A). ROS induce the formation of the mitochondrial transition pore (MTP), initiating the intrinsic apoptotic pathway. Activation of effector caspase-3 by the apoptosome leads to degradation of Bcl-2, thus allowing Bax to form additional pores in the mitochondrial membrane and amplifying the apoptotic response. Resistance to bile acid-induced apoptosis in BCS-TC2.BR2 cells (B) is the consequence of their higher basal levels of the antiapoptotic protein Bcl-2 compared to BCS-TC2 cells. Although caspase-3 is active after bile acid treatments in resistant cells, its activity is not enough to cleave Bcl-2 to the same extent than that achieved in butyrate-sensitive cells. Therefore, Bax remains sequestered and the apoptotic feedback loop is blocked.

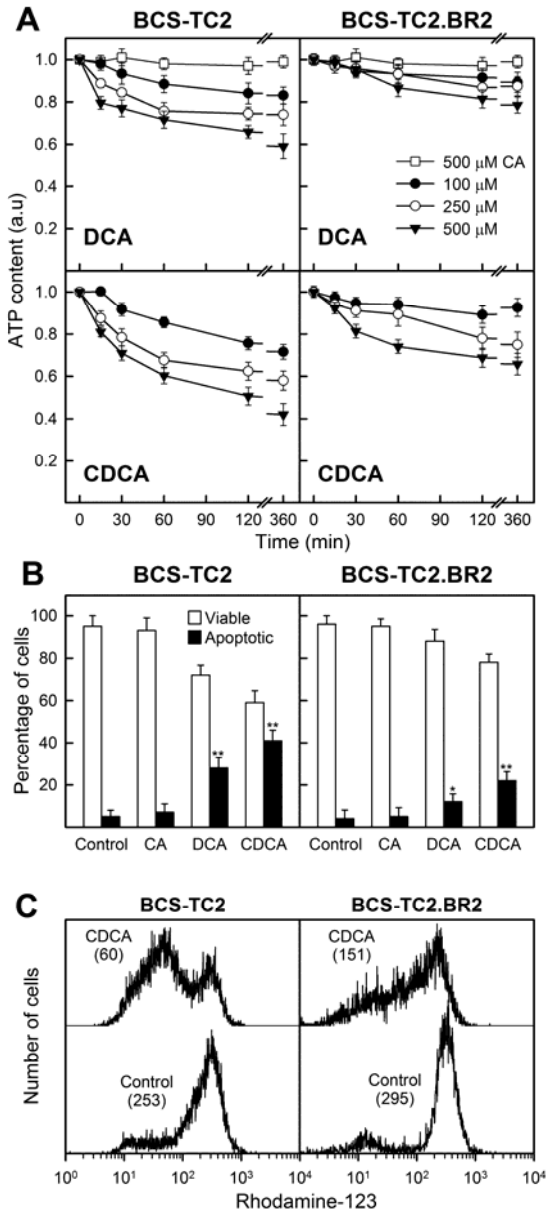


Figure 1

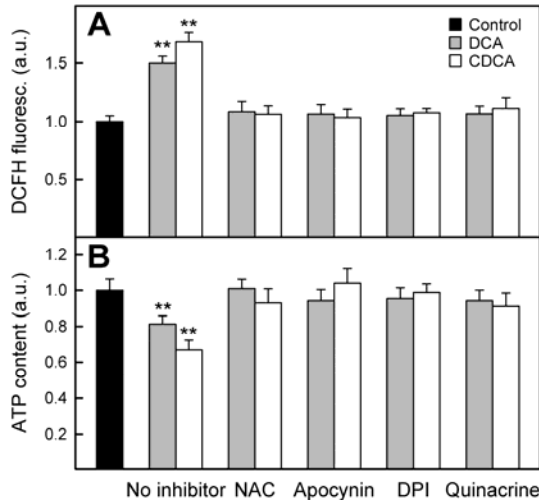


Figure 2

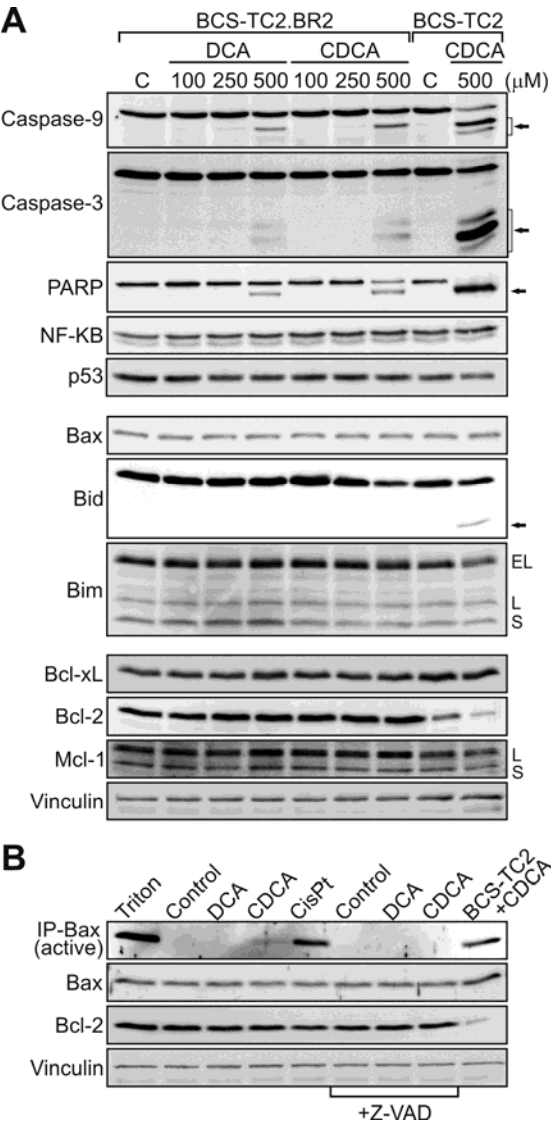


Figure 3

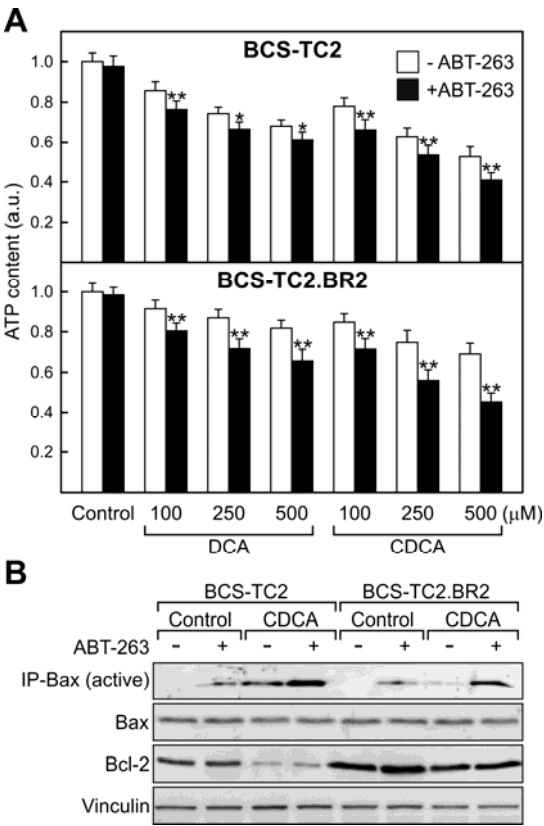


Figure 4

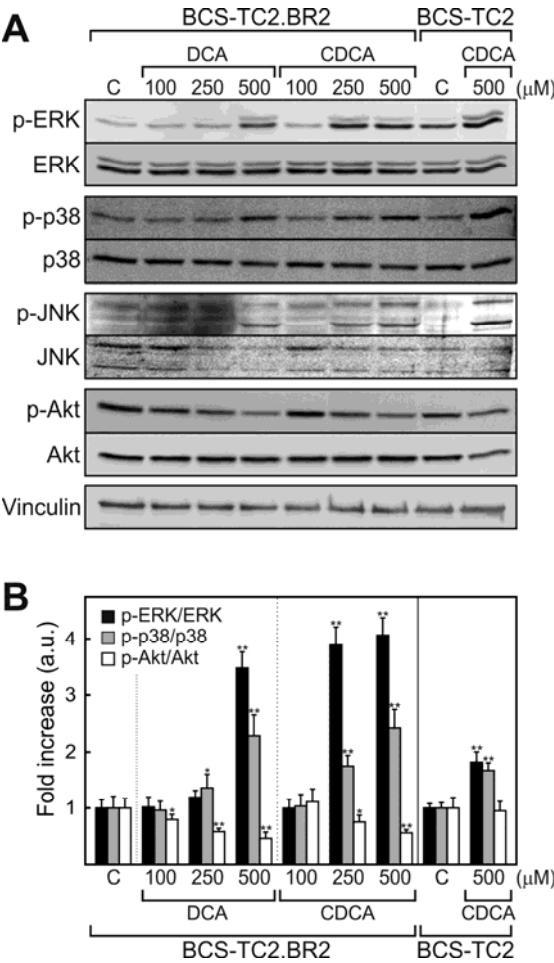


Figure 5

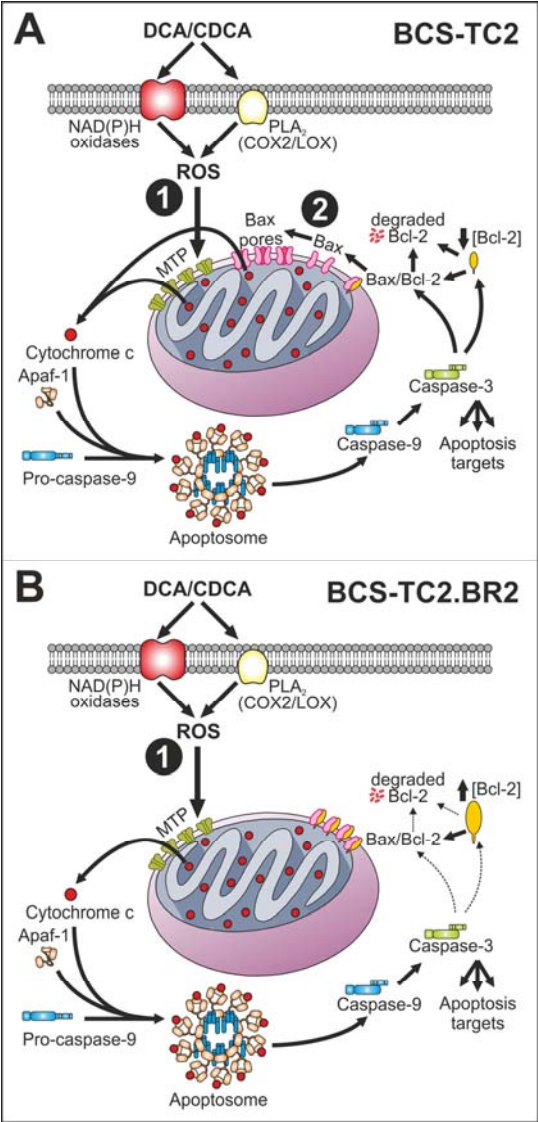


Figure 6

4.1.3. Revisión bibliográfica: *Bile acids, from healthy to cytotoxic molecules*

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas que actúan como detergentes naturales emulsionando las grasas de la dieta durante el proceso digestivo. Además de esta función fisiológica principal, estos compuestos participan en otros muchos procesos como la absorción de calcio, regulación de enzimas digestivas o modulación de rutas de señalización. Pero, por otro lado, se ha demostrado que la exposición continuada a altas concentraciones de ácidos biliares debido a dietas ricas en grasas, o a diferentes patologías, tiene efectos citotóxicos e incluso podría estar relacionada con procesos de carcinogénesis. Aunque los mecanismos moleculares de esta citotoxicidad han sido estudiados en profundidad en hepatocitos, los datos relativos a sus efectos en células del tracto intestinal son más limitados. Dado el estudio que hemos realizado en células de adenocarcinoma de colon humano, se ha planteado realizar una recopilación bibliográfica acerca de los datos disponibles sobre la regulación de los procesos de proliferación, apoptosis y señalización celular por ácidos biliares en células de colon, así como de su implicación en procesos de tumorigénesis colorrectal.

Artículo 3: *Bile acids, from healthy to cytotoxic molecules*

Manuscrito enviado a publicar

Partiendo del conocimiento de su síntesis y fisiología, se presentan los datos disponibles acerca de los mecanismos de citotoxicidad y muerte celular inducidos por los ácidos biliares en células de colon. En este sentido, estos agentes parecen inducir apoptosis en hepatocitos a través de la ruta extrínseca (dependiente de receptor). En cambio, en células de colon parece clara la activación de la ruta mitocondrial dependiente de la formación del apoptosoma. En cualquier caso, se ha intentado recoger los resultados más significativos no sólo acerca de estas dos rutas principales de apoptosis, sino también de la menos conocida ruta de estrés del retículo endoplásmico, así como de la respuesta inducida por daño en el DNA y el estrés oxidativo promovido por los ácidos biliares. El incremento de las especies reactivas de oxígeno por estos agentes puede deberse tanto a perturbaciones estructurales y fisicoquímicas de la membrana, que alteran la actividad de enzimas presentes en ella, como a un estrés directo sobre la mitocondria. Esto promueve la transición de permeabilidad

mitocondrial, lo que implica no solamente la liberación de factores proapoptóticos al citoplasma, sino también una pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y el mal funcionamiento de la cadena de transporte electrónico, lo que amplifica la formación de especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, se abarca también el análisis de las rutas de señalización celular moduladas por ácidos biliares, destacando su papel sobre receptores de membrana así como sobre los diferentes miembros de la familia de las MAP-quinasas. Finalmente se discute el posible papel de los ácidos biliares como agentes procarcinogénicos, ya que numerosos estudios han puesto de manifiesto la correlación positiva entre una dieta rica en grasas, elevados niveles de ácidos biliares y el desarrollo de tumores. Se incluye también un breve epígrafe acerca de los potenciales efectos protectores de estos compuestos, principalmente los descritos para el UDCA.

Aportación personal

En esta revisión se ha participado tanto en la búsqueda bibliográfica como en la elaboración directa del manuscrito.

Review

Bile acids, from healthy to cytotoxic moleculesJuan I. Barrasa, Nieves Olmo, M^a Antonia Lizarbe and Javier Turnay*

Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemistry, Complutense University, 28040-Madrid, Spain

Keywords: apoptosis, bile acids, colon, colorectal cancer, oxidative stress** Corresponding author at:* Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemistry, Complutense University, 28040-Madrid, Spain. Tel. +34 91 394 4256; Fax: +34 91 394 4159*E-mail address:* turnay@bbm1.ucm.es**ABSTRACT**

Bile acids are natural detergents mainly involved in facilitating the absorption of dietary fat in the intestine. In addition to this absorptive function, bile acids are also essential in the maintenance of the intestinal epithelium homeostasis. To accomplish this regulatory function, bile acids may induce programmed cell death fostering the renewal of the epithelium. However, some cells may develop resistance to these molecules, being this one of the mechanisms by which cell transformation in the colon may occur. Here we first discuss on the different molecular pathways of cell death focusing on apoptosis in colon epithelial cells. Bile acids may induce apoptosis in colonocytes through different mechanisms. In contrast to hepatocytes, the extrinsic apoptotic pathway seems to have a low relevance regarding bile acid cytotoxicity in the colon. On the contrary, these molecules mainly trigger apoptosis through direct or indirect mitochondrial perturbations, where oxidative stress plays a key role. In addition, bile acids may also act as regulatory molecules involved in different cell signaling pathways in colon cells. There is increasing evidence that the continuous exposure to certain hydrophobic bile acids may induce colorectal carcinogenesis through appearance of apoptosis resistance as a consequence of DNA damage caused mainly by oxidative stress. On the other hand some bile acids as UDCA has been described as protective molecules against the cytotoxic effects of other luminal compounds.

Contents

1. Introduction
2. Programmed cell death
3. Molecular pathways of apoptosis
 - 3.1 Mitochondrial or intrinsic pathway
 - 3.2 Death receptor or extrinsic pathway
 - 3.3 Endoplasmic reticulum pathway
4. Apoptosis in the colon
5. Bile acids and apoptosis in colon cells
 - 5.1 The death receptor pathway
 - 5.2 The mitochondrial pathway
 - 5.3 The endoplasmic reticulum pathway
 - 5.4 DNA damage and p53
6. Bile acids and cell signaling in colon cells

7. Oxidative stress induced by bile acids in colon cells
8. Colorectal carcinogenesis and bile acids
9. UDCA and the protective effects of bile acids
10. Conclusions

Abbreviations: Apaf-1, apoptotic protease-activating factor-1; BH, Bcl-2 homology; CA, cholic acid ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid); CDCA, chenodeoxycholic acid ($3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid); DCA, deoxycholic acid ($3\alpha,12\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid); DISC, death-inducing signaling complex; EGFR, epidermal growth factor receptor; ER, endoplasmic reticulum; FXR, farnesoid X receptor; *GADD153*, growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153; LCA, lithocholic acid (3α -hydroxy- 5β -cholanoic acid); MAPK, mitogen-activated protein kinase; MPT, mitochondrial permeability transition; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protein kinase C; PLA₂, phospholipase A2; PLC, phospholipase C; PTP, mitochondrial permeability transition pore; PXR, the pregnane X receptor; ROS, reactive oxygen species; TNF, tumor necrosis growth factor; TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand; UDCA, ursodeoxycholic acid ($3\alpha,7\beta$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid); UPR, unfolded protein response; VDAC, the voltage-dependent anion channel; VDR, vitamin D receptor.

1. Introduction

The maintenance of gastrointestinal mucosa function and structure requires a strict controlled balance between cell proliferation, differentiation and apoptosis. Cell behavior and survival are influenced by luminal components including several physiological molecules such as butyrate and bile acids (Haza et al., 2000). It is well known that the content of the lumen depends on the diet. A high intake of dietary fiber and low saturated fats is associated with a reduced incidence of colorectal cancer; this protective effect has been attributed to butyrate, an end-product of colonic fiber fermentation and the major natural regulator of homeostasis of the normal colonic mucosa (Andoh et al., 2003; Velazquez et al., 1997). Other molecules from the intestinal lumen, among them bile acids and salts, may also affect the colorectal epithelium. A proposed mechanism for the influence of a diet with a high content in saturated fats in carcinogenesis is the stimulation of bile discharge; secondary bile acids would alter intestinal epithelium growth acting as tumor promoters (Bernstein et al., 2005). On the other hand, these molecules induce apoptosis and it has been suggested that a decrease in susceptibility to these agents may correlate with an increased risk for colorectal cancer (Schlottman et al., 2000). In fact, it has

been described that bile acids are involved as etiologic agents in cancer of the gastrointestinal tract, including cancer of the esophagus, stomach, small intestine, liver, biliary tract, pancreas and colon/rectum (Bernstein et al., 2009).

Bile acids are amphipathic and water-soluble end products of cholesterol metabolism; they have 24 carbon atoms and constitute a major part of the bile. Some of their properties are related to their amphipathic nature. They are digestive molecules whose main physiological function is to help in the emulsion and absorption of dietary fats and liposoluble vitamins in the gut, and the excretion of cholesterol into the intestinal tract. At the intestinal level, bile acids modulate pancreatic enzyme secretion and cholecystokinin release, and they are potent antimicrobial agents that prevent bacterial over-growth in the small bowel. Bile acids also stimulate biliary lipid secretion and are able to form mixed micelles together with biliary phospholipids, which allows the solubilization in bile of cholesterol and other lipophilic compounds. On the other hand, bile acids are molecules with potentially membrane-damaging properties and they act as calcium ionophores; these properties have been related to the hydrophobicity of the steroid nucleus.

6. Bile acids and cell signaling in colon cells

Primary bile acids are synthesized in the liver from cholesterol through a cascade of reactions catalyzed by enzymes located at the cytosol, microsomes, mitochondria, and peroxisomes. The modification of the sterol nucleus of cholesterol precedes the oxidative cleavage of its side chain; it begins with the hydroxylation of cholesterol at C-7, catalyzed by cholesterol 7 α -hydroxylase, the rate-limiting enzyme of the pathway. In humans, the two primary cholic (CA) and chenodeoxycholic (CDCA) bile acids are synthesized through this pathway. Extensive descriptions of these reactions and enzymes can be found elsewhere (Hylemon et al., 2009; Monte et al., 2009; Perez and Briz, 2009). After their synthesis, CA and CDCA are conjugated with glycine or taurine in the liver, stored in the gall bladder and then released into the intestinal tract. During the intestinal transit, these molecules are mainly absorbed in the ileum but a small fraction continues its transit into the large bowel, where they undergo modifications by intestinal anaerobic bacteria. This biotransformation in the human colon involves mainly deconjugation and oxidation/epimerization of hydroxyl groups at C-3, C-7 and C-12 as well as dehydroxylation at position C-7. Bacterial dehydratases remove the hydroxyl group at C-7 yielding the secondary deoxycholic (DCA) and lithocholic (LCA) bile acids derived from CA and CDCA, respectively. The ursodeoxycholic acid (UDCA) is formed in the distal or large intestine by bacterial epimerization of the hydroxyl group in C-7. The structures of some of the most abundant bile acids are shown in Figure 1.

The unconjugated bile acid UDCA is considered as a cytoprotector for hepatocytes (Amaral et al., 2009; Paumgartner and Beuers, 2002) whereas CDCA is highly cytotoxic, but the only structural difference between them is the configuration of the hydroxyl group at C-7 (β in UDCA and α in CDCA), revealing the importance of the stereospecificity in the cytotoxic mechanisms of these agents. In contrast to the toxic effects of hydrophobic bile acids, UDCA is hydrophilic and is used as a therapeutic drug for patients with cholestatic liver diseases, and its use has been approved by

the FDA for the treatment of primary biliary cirrhosis. Despite its clinical efficacy, the precise mechanism by which UDCA improves liver function is still not entirely understood and controversial results have been reported (Wood, 2011).

2. Programmed cell death

Programmed cell death is an essential physiological process in the homeostasis of the organisms that is triggered by different death stimuli. Rather than necrosis, which is an unregulated and passive cell death, programmed cell death is an active process that is governed by signaling pathways, protein activation cascades and modulation of gene expression. Although programmed cell death has been usually identified as a synonymous of apoptosis, it also includes different caspase-independent death programs as autophagy, paraptosis or mitotic catastrophe (Broker et al., 2005; Chowdhury et al., 2006; de Bruin and Medema, 2008). Each of these death processes involves different organelles and molecular pathways. Thus, in autophagy, long-lived organelles and other cytoplasmic components are degraded by lysosomes. Although its main function is cellular remodeling, when cells undergo excessive autophagy they are triggered to die in a nonapoptotic way (Glick et al., 2010). Regarding paraptosis, it shares several features with autophagy, and is characterized by a cytoplasmic vacuolization and perturbation in mitochondria and endoplasmic reticulum, but without involvement of caspases during the death program (Sperandio et al., 2000). Mitotic catastrophe occurs during mitosis and is triggered by failures in the regulation of cell cycle checkpoints usually by DNA damage or microtubule destabilization (Vakifahmetoglu et al., 2008). Although it involves mitochondrial permeabilization and caspase activation, it has been proposed that this death program does not correspond with apoptosis as it is not prevented by caspase inhibitors or Bcl-2 overexpression.

3. Molecular pathways of apoptosis

Apoptotic cells show several characteristic features derived from the activation of the

specific processes, such as loss of membrane asymmetry, DNA condensation, internucleosomal degradation, and cell shrinkage with subsequent membrane blebbing (Chowdhury et al., 2006). The resulting cellular debris can be digested by neighboring cells or by macrophages of the immune system. Apoptosis can occur by several molecular pathways (Schultz and Harrington, 2003), but the best characterized ones are the *intrinsic pathway*, that involves mitochondrial perturbations, and the *extrinsic pathway*, which requires the activation of membrane receptors through different extracellular stimuli. An alternative mechanism of apoptosis occurs through stress of the endoplasmic reticulum (ER) and is characterized by perturbations in protein processing and transport, and loss of calcium homeostasis. Despite the different mechanisms and characteristics of each of these pathways, all of them eventually converge in the activation of the caspase family of proteases. These proteases cleave different nuclear and cytoplasmic targets within the cells and constitute the real effectors of the apoptotic program. Here we will briefly describe the molecular mechanisms involved in the different apoptotic pathways.

3.1 Mitochondrial or intrinsic pathway

The mitochondrial pathway mainly involves two protagonists with a leading role in the activation of the apoptotic program: the mitochondria, and the Bcl-2 protein family members (Parone et al., 2002). This intrinsic pathway is triggered by different intracellular stresses that eventually lead to perturbations in the mitochondria with subsequent membrane permeabilization, loss of mitochondrial membrane potential and release of proapoptotic proteins. The loss of the mitochondrial membrane integrity can occur by two different mechanisms. First, several death stimuli and intracellular stresses are thought to trigger the mitochondrial permeability transition (MPT). The mitochondrial permeability transition pore (PTP) is a multiprotein complex that contains the voltage-dependent anion channel (VDAC) in the outer membrane, the adenine nucleoside translocator (ANT) in the inner membrane, the

matrix mitochondrial protein cyclophilin D, creatine kinase from the intermembrane space, and cytosolic hexokinase. The increased permeability after MPT induction allows the release of proapoptotic factors from the mitochondria, such as cytochrome *c*, which are key molecules in the initiation of the apoptotic program (Desagher and Martinou, 2000). Bcl-2 family members play also an essential role in the intrinsic apoptotic pathway. This family of proteins consists of both anti-death and pro-death molecules, all of them characterized by the presence of Bcl-2 homology (BH) domains (Chipuk et al., 2010). The anti-apoptotic family members, which include Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, and Mcl-1, among others, contain four conserved BH domains (BH1–BH4). Most of them also present a C-terminal transmembrane domain that targets them to the cytoplasmic surfaces of various intracellular membranes, including the outer mitochondrial membrane and the endoplasmic reticulum. The pro-apoptotic family members can be subdivided into two different groups. The first one includes Bax and Bak, lack the N-terminal BH4 domain but contain the other BH domains. The second group, which includes Bid, Bad, Bim, Noxa, and PUMA, among others, only share sequence homology in their BH3 domains. The members of this last group are also known as “BH3-only” pro-death proteins, in comparison to those of the other groups that are BH multidomain proteins. This system works as a rheostat, where the sensitivity of the cell to a death stimulus depends on the interaction between both anti- and pro-apoptotic BH proteins to form homodimers or mixed heterodimers. Different apoptotic stimuli can lead to conformational changes in the multidomain pro-death members Bax and Bak, triggering their oligomerization and insertion in the mitochondrial membrane to form pores (Degli Esposti and Dive, 2003). On the other hand, anti-apoptotic Bcl-2 family members seem to prevent this oligomerization by direct interaction and heterodimerization with Bax and Bak, while the BH3-only pro-apoptotic members are thought to impair this interaction by heterodimerization with the anti-apoptotic members, thus liberating Bax and Bak to form pores and increase mitochondrial

permeabilization. Additionally, the BH3-only protein Bid interacts directly with Bax and Bak promoting their insertion in the outer mitochondrial membrane.

Independently of the mechanism involved in the increased mitochondrial permeability (mitochondrial permeability transition or Bax/Bak oligomerization), the main consequence of the apoptotic stimuli is the release of pro-apoptotic factors from the mitochondria to the cytosol. Among them, the most important and better studied one is cytochrome *c*. This small molecule, once released to the cytosol, form a complex with the apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) (Ow et al., 2008). Apaf-1 then undergoes an ATP-dependent conformational change and binds procaspase-9. The resulting multiprotein complex, known as *apoptosome*, contains multiple Apaf-1 and procaspase-9 molecules (Riedl and Salvesen, 2007). The proximity of these procaspases in the apoptosome is thought to trigger their autocleavage thus yielding the fully active caspase-9. Finally, initiator caspase-9 is then able to activate downstream caspases, such as caspase-3, and initiate the cellular disassembly.

3.2 Death receptor or extrinsic pathway

Death receptors are cell-surface receptors that trigger death signals following recognition and binding to their cognate ligands. Death receptors belong to the tumor necrosis/nerve growth factor (TNF/NGF) receptor superfamily, and all of them are type I transmembrane proteins with a C-terminal intracellular tail, a membrane-spanning region, and an extracellular ligand-binding N-terminal domain. The most important feature of this family of receptors is their homology in a region containing one to five cysteine-rich repeats in the extracellular domains, and the presence of a conserved cytoplasmic sequence termed as *death domain* (DD). The best characterized death receptors are the TNF receptor-1 (also known as TNFR1, p55 or CD120a), CD95 (also termed Fas or Apo-1) and TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) receptors 1 and 2 (also known as DR4 and DR5, respectively) (Bhardwaj and Aggarwal, 2003). The molecular signal events

start with the binding of the cognate ligand to the death receptor, thus inducing conformational changes that eventually promote the oligomerization of the receptors and the assembly of a protein complex known as death-inducing signaling complex (DISC). These complexes present several adapter proteins with no enzymatic activity but which are able to associate with receptors through homophilic interaction via death domains. These adapter proteins contain a death effector domain (DED) that mediates the recruitment of pro-caspases 8 and 10 to the DISC, leading to their autoproteolytic cleavage and activation (Mahmood and Shukla, 2010). Caspase-8 is the most important death receptor-activated initiator caspase and, depending on the cell type, can trigger different death signal cascades. Thus, in the so-called type I cells, activation of caspase-8 is enough to initiate the apoptotic program by direct cleavage of downstream effector caspases 3 and 7. On the other hand, in type II cells, such as hepatocytes, caspase-8 activation is not sufficient to trigger the apoptotic program and requires the amplification of the death signal by induction of mitochondrial perturbations. Under these circumstances, caspase-8 cleaves inactive Bid, yielding an active truncated form of Bid known as tBid (or p15). tBid is then able to induce conformational changes in Bax and Bak leading to their oligomerization with the subsequent mitochondrial disruption and release of proapoptotic factors, such as cytochrome *c* or the XIAP inhibitor Smac/DIABLO, triggering the intrinsic apoptotic pathway (Kantari and Walczak, 2011).

3.3 Endoplasmic reticulum pathway

When endoplasmic reticulum (ER) homeostasis is compromised by different stresses, the unfolded protein response (UPR) is activated to prolong cell survival by increasing protein folding, facilitating the degradation of misfolded proteins, and inhibiting protein synthesis. But cells that are subjected to a sustained and irreversible stress eventually undergo apoptosis. ER can regulate apoptosis not only by its own, but also by communicating with mitochondria (Rasheva and Domingos,

2009). Thus, increased cytosolic Ca^{2+} level that follows ER stress results in dephosphorylation and translocation of Bad to the mitochondria which facilitates Bax/Bak activation. On the other hand, sustained UPR can induce apoptosis by activation of the transcription factor CHOP (also known as GADD153, *growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153*), that represses the transcriptional expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Szegezdi et al., 2006). These, and other mechanisms of regulation of additional Bcl-2 family members by ER stress, highlight the importance of the cross-talk between the mitochondria and the ER. Finally, and regarding caspase activation, it is important to mention the role of caspase-12 in the ER apoptotic pathway. Caspase-12 is localized at the cytosolic face of the ER, and seems to be specifically activated by ER stresses and not by death receptor or mitochondrial pathways. Caspase-12 activation seems to be the result of a Ca^{2+} -dependent activation of calpain after ER stress. Active calpain cleaves procaspase-12 yielding the active enzyme initiates a proteolytic cascade by activation of caspase-9 in a cytochrome *c*-independent manner (Momoi, 2004).

4. Apoptosis in the colon

Apoptosis is an essential mechanism for the homeostasis of the organisms, being the colonic epithelium one of the best examples of the regulatory properties of this programmed cell death. The intestinal epithelium is a rapidly renewing tissue whose homeostasis depends on the correct equilibrium between cell proliferation and cell death. The anatomy of the colonic epithelium consists in “hills and valleys” shaped structures called crypts, formed by a single layer of epithelial cells (Figure 2). It is well established that these colon crypts show a polarized topographical organization where the position of a specific cell is closely related with its function, behavior, proliferation ability and fate (Radtke and Clevers, 2005). The mature colon epithelium is composed of two main types of differentiated cells, enterocytes and goblet cells, with a minor population of endocrine cells. Goblet cells are mainly found in the middle area of the crypts, and their

function is the secretion of mucin. Endocrine cells are usually confined to the lower third base of the crypts, and absorptive enterocytes, also known as colonocytes, are found at the top third and surface of the crypt. On the other hand, colon undifferentiated stem cells occupy the bottom of these structures. Thus, the differentiation state of the cells depends on their position along the crypt, with the less differentiated cells at the bottom, and the more differentiated ones at the top. This differentiation process, and its associated morphological changes, takes place during migration towards the lumen. When colonocytes reach the surface of the crypt the differentiation process is complete. But, for an efficient and correct function of the colon, removal of senescent colonocytes is essential. While some of these cells are mechanically removed by the exfoliating action of passage of the lumen components, the main important process regulating their renewal is apoptosis (Potten, 1998; Potten et al., 1997). In this regard, it has been described that Bcl-2 expression decreases upward along the crypts, showing the highest expression levels at the bottom and minimal amounts at the top (Renehan et al., 2001). Thus, the balance between cell renewal and apoptosis is responsible for the maintenance of the size and structure of the colon. Moreover, apoptosis is also an essential defense mechanism against genotoxic damage induced by potential diet carcinogens, as bile acids. When these mechanisms of control are lost, abnormal cell growth can occur and colon cancer may arise.

5. Bile acids and apoptosis in colon cells

The apoptotic effect of bile acids has been extensively analyzed in hepatocytes. However, during the last years, an increasing interest is raising in the study of the cytotoxic effect of these compounds in colon epithelial cells and other gastrointestinal cell lines, either normal or tumorigenic. Among them, we have focused this review in colon cells as they are one of the main targets of bile acids within the gastrointestinal tract. Different experimental models have been used for the analysis of the regulatory and cytotoxic effects of bile acids in

colon (Table 1). Most of the studies have been developed in colon cancer cell lines, among them Caco-2, HT29 and HCT-116, although these effects have also been analyzed in tissues of colon cancer patients, mice models, normal colonocytes and FHC cells. The latter were established from normal fetal colonic mucosa by Siddiqui and Chopra (Siddiqui and Chopra, 1984) but recently a mutation in *TP53* together with a tumorigenic phenotype have been described for these cells (Soucek et al., 2010).

There are several reasons for a better understanding of the influence of bile acids in the colonic tract. It is important to take into account that, besides deconjugation of taurine and glycine, one of the main processes during the transformation of bile acids occurs in the colon: the anaerobic bacterial flora of the colon carries out the 7 α -dehydroxylation of the primary bile acids CA and CDCA to yield, respectively, the secondary bile acids DCA and LCA. In addition, and more important, the rising evidence for the pro-carcinogenic role of bile acids in colon by the selection of a cell population resistant to the apoptotic effects of these agents. Thus, here we will briefly review the different apoptotic pathways triggered by bile acids in colon cells, which are summarized in Figure 3.

5.1 The death receptor pathway

Death receptors are cell surface cytokine receptors belonging to the tumor necrosis/nerve growth factor (TNF/NGF) receptor superfamily. Among them, the best studied ones are Fas (CD95), TNF-R1 and TRAIL-R1. Although it has been previously demonstrated that hepatocytes are able to respond to bile acids via CD95, this death receptor-mediated response does not seem to be active in colon cells. In this regard, there are several experimental evidences indicating death receptor-independent apoptotic effects of bile acids in colon cells (Schlottman et al., 2000; Wachs et al., 2005). It has been observed that the CD95-negative Caco-2 and SW620 cells undergo bile acid-induced apoptosis. On the other hand, CD95-positive HT-29 and SW480 cells do not suffer apoptosis after treatment with the agonist anti-Fas antibody CH-11 (Schlottman et al., 2000).

Interestingly, activation of caspase-8 has been detected in different colon cancer cell lines after treatment with bile acids. These observations contrast with the previously mentioned death receptor-independent bile acid-induced apoptosis, though different possible mechanisms of caspase-8 activation have been postulated. On this idea, a direct activation by bile acids, or by caspases that are downstream of the perturbation of the mitochondrial transmembrane potential such as the initiator caspase-9, has been reported (Schlottman et al., 2000). In contrast, Katona and coworkers support the idea that bile acid-induced apoptosis is dependent on CD95 in HT-29 and HCT-116 cells due to their observations of the specific activity of different synthetic enantiomers of LCA, DCA and CDCA, and their ability to activate caspase-8 (Katona et al., 2009). These authors suggest that, after treatment with different bile acids, the subsequent generation of reactive oxygen species (ROS) can lead to CD95 translocation and oligomerization, dependent on epidermal growth factor receptor (EGFR) activity, with the consequent activation of caspase-8. In contrast, we have observed that apoptosis induced by DCA and CDCA in human colon adenocarcinoma BCS-TC2 cells is dependent on activation of caspase-9 with no significant activation of caspase-8 (Barrasa et al., 2011). Finally, Wachs and coworkers have described that colon cancer cells may down-regulate CD95 surface expression, or develop signaling strategies that inhibit the CD95 receptor signaling pathway, to escape the pro-apoptotic killing by cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes (Wachs et al., 2005).

5.2 The mitochondrial pathway

The apoptotic program triggered by mitochondrial membrane perturbations is probably the best characterized one in colon cancer cells. Several works report on the ability of bile acids to induce changes in the mitochondrial membrane permeability with the subsequent release of proapoptotic molecules such as cytochrome *c* or Smac/Diablo. Cytochrome *c* release is followed by apoptosome formation and caspase-9 activation. Bile acid-induced apoptosis through this

mitochondrial pathway has been described in HCT-116, HT-29, Caco-2, SW480, SW620 and BCS-TC2 cells (Barrasa et al., 2011; Payne et al., 2007; Wachs et al., 2005; Washo-Stultz et al., 2002). Regarding HCT-116 cells, it has been proposed that bile acid treatment, mainly DCA, promotes the release of cytochrome *c* from the mitochondria by an undefined but specific mechanism (Yui et al., 2005). One hypothesis is that DCA generates increased ROS production by activation of plasma membrane associated proteins such as NAD(P)H oxidases and PLA₂ with the subsequent mitochondrial oxidative stress, loss of mitochondrial membrane potential and release of pro-apoptotic factors (Payne et al., 2007). On the other hand, ROS can also be produced by direct bile acid-induced mitochondrial damage by different mechanisms, such as direct oxidative damage, endogenous generation of arachidonic acid, truncation of Bid (tBid) from ligand-independent activation of the Fas receptor (FasR), release of Bak from the stressed ER, or the decay of mitochondrial NAD⁺ levels as a result of ROS induced DNA damage and subsequent increase in poly(ADPribose) polymerase (PARP) activity (Bernstein et al., 2005). Supporting this notion, it has been observed that treatment with different inhibitors of mitochondrial complexes I-V protect HCT-116 cells against DCA-induced apoptosis (Payne et al., 2005). Moreover, rottlerin [a well-known generic protein kinase C (PKC) inhibitor] presents antioxidant activity and is able to largely protect HCT-116 cells against the genotoxic effects of DCA (Longpre and Loo, 2008). It is also interesting to mention that DCA is able to induce the mitochondrial apoptotic program in HCT-116 cells in the absence of Bax (Yui et al., 2008). Although Bax is one of the most important proapoptotic members of the Bcl-2 family whose oligomerization promotes the appearance of pores in the mitochondrial membrane, it is thought that the increased ROS generation after DCA treatment is enough to promote the mitochondrial permeability transition with the subsequent release of cytochrome *c* in a Bax-independent manner. Supporting this idea, we have observed that

DCA and CDCA are able to trigger apoptosis in BCS-TC2 cells through an increase in ROS generation that promotes the mitochondrial permeability transition and subsequent activation of caspase-9. However, this response is followed by an amplification of the apoptotic signal via Bcl-2 degradation and Bax activation, although MPT seems to be an initial step in this bile acid-induced apoptosis (Barrasa et al., 2011).

5.3 The endoplasmic reticulum pathway

The ER integrity and calcium homeostasis have been previously related with the triggering of the apoptotic program mainly by activation of caspase-12. Little is known about this apoptotic pathway in colon cells, although several works point out to a secondary role of the ER during bile acid-induced apoptosis. In Caco-2 and HT-29 cells, an increase in the intracellular levels of Ca²⁺ has been observed after DCA treatment, with the subsequent triggering of apoptosis (Lau et al., 2005; Marchetti et al., 1997). Although the mechanisms responsible for this activation are not yet known, it has been proposed that DCA may activate PLC. The subsequent production of IP₃ and DAG leads to a Ca²⁺ release from the ER to the cytoplasm that, in turn, can drive the activation of signaling pathways, such as PKC. On the other hand, it has also been observed that in HCT-116 cells that DCA is able to generate dilatation of the ER together with mitochondrial stress. Nevertheless, this ER stress seems to be a secondary effect of the mitochondrial alterations, as treatment with several inhibitors of mitochondrial complexes I-V not only protects against the apoptotic effect of DCA, but also against the mitochondrial and ER stresses generated by this bile acid (Payne et al., 2005).

5.4 DNA damage and p53

Several studies have demonstrated the ability of bile acids to induce DNA damage in different colon cells, such as HCT-116, HT-29, Caco-2 and FHC (Haza et al., 2000; Marchetti et al., 1997; Powolny et al., 2001; Rosignoli et al., 2008). This genotoxic effect has been related to

an increase in ROS generation after bile acid treatments (mainly DCA and LCA), as different dietary antioxidants as β -carotene and α -tocopherol exert a protective effect (Rosignoli et al., 2008). Thus, the role of p53 in the apoptotic response to bile acids in colon cells has been considered. As p53 is a tumor suppressor gene strongly related with the apoptotic response to cellular stresses, mainly DNA damage, the hypothesis that bile acid-induced apoptosis could be dependent on p53 function was strongly suggested. However, data obtained in different colon cancer cells do not support this notion, as DCA is able to trigger apoptosis in a p53-independent manner after DNA damage. DCA induces DNA damage and apoptosis in human colon epithelial cells expressing either mutant (HCT-15, Caco-2 and HT-29 cells) or wild-type p53 (HCT-116 cells) (Powolny et al., 2001). Interestingly, it has also been observed that DCA is able to stimulate the proteasome-mediated p53 protein degradation in HCT-116 cells (Qiao et al., 2001a). This, in turn, could enhance bile acid-induced mutagenesis and lead to increased cancer risk. Last, but not least, the importance of GADD153 in the apoptosis induced by bile acids should be mentioned. It has been demonstrated that DCA strongly increases the expression of GADD153 in HCT-116 cells, being this gene essential for bile-acid induced apoptosis (Qiao et al., 2002). This type of GADD153-dependent and p53-independent bile acid-induced apoptosis was also previously observed in the non-colonic cervical adenocarcinoma HeLa cells (Zheng et al., 1996).

6. Bile acids and cell signaling in colon cells

During the last years it has become progressively more evident that bile acids are able to trigger different signaling pathways within the cells. In this regard, several reports point out towards different mechanisms to develop these regulatory effects. Although these signaling processes have been better characterized in hepatocytes (Hylemon et al., 2009), we will focus this review in colon cells, where bile acids act in similar ways than in other enterohepatic cells, but differ in some mechanisms and responses (Figure 4). It has

been reported that bile acids are able to induce alterations in the plasma membrane of HCT-116 and Caco-2 cells leading to changes in its physicochemical properties and lipid composition (Akare and Martinez, 2005; Jean-Louis et al., 2006). These effects are closely related to their hydrophobicity as they can be mimicked by other hydrophobic molecules unrelated to bile acids. DCA and other bile acids induce an increase in the quantity of cholesterol in the plasma membrane, which is accompanied by an overall decrease in membrane fluidity. It has been hypothesized that this could be a cell response to prevent bile acid-induced cell membrane lysis generated by their detergent-like properties (Jean-Louis et al., 2006). The main consequence of these membrane perturbations is the activation of different signaling pathways, among them those involving PKC and EGFR. Regarding PKC α , it is thought that bile acid-induced activation is a consequence of changes in the membrane curvature and in its structure and phospholipid composition, as it has been previously reported that this PKC is strongly influenced by the physicochemical properties of membrane (Akare and Martinez, 2005). Moreover, Looby and coworkers observed that DCA is able to induce translocation and differential subcellular localization of PKC isoforms β_1 , ϵ and δ in HCT-116 cells, and that the alterations in the activity of the isoforms have an essential role in the development and maintenance of the abnormal morphogenesis of the colonic epithelium (Looby et al., 2005). The activation of PKC and PLC by DCA has been reported through the induction of Ca^{2+} release from the intracellular stores to the cytoplasm (Lau et al., 2005). Although the molecular mechanisms that lead to this Ca^{2+} release are not fully understood, they could be related with the ER stress observed in different colon cancer cells after bile acid treatment.

The ability of bile acids to activate the EGFR pathway in a ligand-independent manner has also been well analyzed. In this regard, it has been suggested that the activation events are similar to those observed with PKC, which are triggered by changes in the composition and structure of the plasma membrane. It is well

known that this family of receptors is usually localized in the plasma membrane microdomains, known as lipid rafts, which are enriched in sphingomyelin, receptors, and cholesterol. DCA is able to modify the quantity and positioning of these lipid rafts in HCT-116 cells consequently leading to intracellular signaling (Jean-Louis et al., 2006). Moreover, it has also been observed that DCA-conjugates stimulate signaling and proliferation in H508 cells that co-express the muscarinic receptor M₃R and EGFR, but not in chinese hamster ovary CHO cells that express only M₃R, or SNU-C4 cells that express only EGFR (Cheng and Raufman, 2005). It has been suggested that many cells require transactivation of EGFR for the mitogenic signaling by ligands for G-protein coupled receptors, like M₃R,. On this idea, the cell surface receptor TGR5 (Kawamata et al., 2003), a G-protein coupled receptor that responds to bile acids, seems to be essential for the bile acid-induced activation of EGFR in gastric cells and for the production of ROS by upregulation of the NADPH oxidase NOX5-S in esophageal cells (Hong et al., 2010; Yasuda et al., 2007), although this receptor is not expressed in colon cells.

One of the most important signaling pathways clearly affected after bile acid treatment in colon cells are the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) cascades. This family of kinases is able to transduce the majority of extracellular signals from the membrane to the nucleus, and is mainly composed by three members: the p38 MAPK, the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and the c-Jun N-terminal kinase (JNK). Several lines of evidence point out towards a bile acid-induced MAPK activation downstream of other signaling cascades in human colon cells. Thus, in HCT-116 and Caco-2 cells, ERK activation after bile acid treatment has been suggested to depends on PKC activation due to changes in the physicochemical properties of the plasma membrane (Akare and Martinez, 2005). In a similar way, it has also been observed that ERK activation takes place downstream the bile acid-induced phosphorylation of EGFR in H508 and SNU-C4 cells (Cheng and Raufman, 2005). On the other hand, it has also been proposed that

increased ROS production in Caco-2 cells after bile acid-induced activation of NADH dehydrogenase and xanthine oxidase, leads to the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) that, in turn, promotes phosphorylation of p38 and ERK (Araki et al., 2005). A similar activation of p38 and ERK has also been observed in HCT-116 cells and it has been proposed to be a pro-survival signal against the pro-apoptotic effects of bile acids (Qiao et al., 2001b).

DCA is also able to activate the β -catenin signaling pathway in SW480 and LoVo cells (Pai et al., 2004). The increased bile acid-induced tyrosine phosphorylation dissociates β -catenin from E-cadherin inducing loss of cell adhesion; it also stabilizes β -catenin and promotes its translocation into the nucleus and subsequently increases the expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, and cyclin D1. Regarding other cell cycle proteins, different effects has been observed after DCA treatment of normal colon cells, and Caco-2 and HCT-116 cells. Thus DCA treatment increases cyclin E levels in HCT-116 cells but not in Caco-2 and normal colonocytes, whereas cyclin A is elevated in Caco-2 and normal colon cells but not in HCT-116 cells (Ha and Park, 2010).

It is also important to mention the nuclear signal events triggered by bile acids in colon cells by direct activation of nuclear receptors or by regulation of different transcription factors. In this regard, there are mainly four bile acid nuclear receptors: the farnesoid X receptor (FXR), the pregnane X receptor (PXR), the liver X receptor and the vitamin D receptor (VDR). Although the main role of these bile acid receptors is the control of the metabolism of lipids and carbohydrates, they are also important regulators of cell proliferation and differentiation, cell death, survival, invasion, and metastasis during normal development and cancer. The expression and activity of these receptors has been analyzed in different colon cell lines. In this regard, FXR expression is down-regulated in colon-derived adenocarcinoma cell lines, being inversely correlated with the differentiation degree. Thus,

the highly tumorigenic and metastatic SW480 and SW620 cells do not express this receptor, while significant levels are detected in the less tumorigenic Caco-2 and HT-29 cells (De Gottardi et al., 2004). Moreover, in two experimental murine models for intestinal cancer FXR deficiency led to a significant increase in the size and number of the tumors (Maran et al., 2009); in addition, FXR^{-/-} APC^{+/-} mice showed adenomatous-like lesions and numerous aberrant crypt foci even before carcinomas had actually formed (Modica et al., 2008). On the contrary, PXR has a protective effect in HCT-116 cells against the apoptotic effects of DCA, being this the result of the altered expression of multiple apoptosis-related genes, such as *Mcl-1*, *BAK1* or *TP53* (Zhou et al., 2008). Regarding VDR its expression is increased in colorectal cancers, and is associated with mutations in *PIK3CA* and *KRAS* although there is not a significant correlation with patient survival (Kure et al., 2009).

7. Oxidative stress induced by bile acids in colon cells

It is well established that one of the most important cytotoxic effects of bile acids is the increased production of reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and subsequent apoptosis triggered by oxidative stress. We have previously pointed out that this bile acid-induced ROS generation is multifactorial. One of the main sources of ROS production by bile acids in colon cells is the activation of several plasma membrane enzymes, such as NAD(P)H oxidases, PLA₂ or PLC. These enzymes are likely activated by alterations in the structure and composition of the plasma membrane, being this effect closely related with the hydrophobicity and detergent-like effects of bile acids (Akare and Martinez, 2005; Jean-Louis et al., 2006). Thus, PLC activation by DCA in HT-29 cells promotes Ca²⁺ release from the ER (Marchetti et al., 1997). In hepatocytes, it has been observed that this intracellular elevated Ca²⁺ levels can lead to an induction in the expression of nitric oxide synthase-3 with the subsequent increase in NO production (Gonzalez-Rubio et al., 2010). Regarding PLA₂, in Caco-2 cells it has been

proposed that bile acids can increase the activity of this enzyme by alteration of the transepithelial permeability (Araki et al., 2005). The subsequent enhanced production of arachidonic acid by PLA₂ leads to an increased generation of ROS by cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes as a by-product of the synthesis of prostaglandins. Bile acid-induced activation of NAD(P)H oxidases has been observed in hepatocytes, and the following increase in ROS production has been shown to be essential for bile acid-induced apoptosis (Reinehr et al., 2005). Although little is known regarding this process in colon cells, we have recently reported that DCA and CDCA induce ROS production mainly through this mechanism with a minor contribution of PLA₂ in BCS-TC2 cells (Barrasa et al., 2011). In addition, membrane perturbations can also activate receptors, such as EGFR or even Fas (CD95), which initiate signal cascades eventually triggering ROS production of ROS. Bile acids can also trigger signaling cascades by ligand-independent activation of plasma membrane receptors, such as EGFR or Fas, via membrane perturbations. Katona and coworkers have proposed a mechanism in HCT-116 and HT-29 cells where bile acids induce apoptosis through Fas activation (Katona et al., 2009). This activation seems to be related with an increased ROS generation that triggers procaspase-8 cleavage. Although this effector caspase is usually related with the extrinsic apoptotic pathway, cleavage of the Bcl-2 pro-apoptotic member Bid to yield tBid can also trigger the mitochondrial intrinsic pathway with the subsequent generation of ROS by dysfunction of the mitochondrial electronic transport complexes. This caspase-8 and Bid-dependent mitochondrial damage is not clear in colon cells; whereas Bid activation by DCA and LCA has been detected in HT-29 and HCT-116 cells (Katona et al., 2009), DCA-induced apoptosis in HCT-116 cells is independent of this pro-apoptotic protein (Yui et al., 2005).

Increased ROS generation may also be a consequence of bile acid-induced perturbations in the mitochondria. Firstly, and in connection with the role of pro-apoptotic proteins in bile acid-induced mitochondrial damage (e.g., tBid),

there are other members of the Bcl-2 protein family that are able to alter the mitochondrial membrane structure leading to a malfunction of the electronic transport chain and a loss of the mitochondrial potential. In addition, bile acids may induce ER stress that can be associated with mitochondrial stress. It is well known that the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bak is associated with the ER membrane. Thus, bile acid-induced damage could stimulate the release of Bak from the reticulum with the subsequent binding to the mitochondrial membrane. In this regard, it has been observed that after ER stress in HEK-293T human embryonic kidney cells, the BH3-only molecules Bim and Puma are able to fully induce cytochrome *c* release from the mitochondria followed by apoptosis in the sole presence of reticular Bak (Klee et al., 2009). Moreover, several reports point out the fact that perturbations in the mitochondrial membrane fluidity by hydrophobic bile acids can lead to a malfunction in the electron transport chain with the consequent generation of ROS (Palmeira and Rolo, 2004). On this idea, it has been described that arachidonic acid promotes ROS generation by interaction with the mitochondrial electron transport chain (Cocco et al., 1999) and, as we have previously mentioned, bile acids increase the intracellular levels of arachidonic acid through the stimulation of PLA₂ activity.

Regarding bile-acid induced ROS generation, the redox-sensitive transcription factor NF- κ B should be considered. This transcription factor is crucial in different cellular processes, such as inflammation, immunity, cell proliferation and apoptosis. It has been previously shown in different types of cells that NF- κ B can be activated by ROS-dependent and ROS-independent signaling pathways (Gloire et al., 2006; Morgan and Liu, 2011). In HCT-116 and HT-29 cells, DCA is able to activate NF- κ B expression through different mechanisms, including NAD(P)H oxidases, Na⁺/K⁺-ATPase, cytochrome P450, Ca²⁺ and the terminal mitochondrial respiratory complex IV (Glinghammar et al., 2002; Payne et al., 2007). This NF- κ B increased expression constitutes a survival mechanism as a response

to the DNA-induced oxidative stress. Interestingly, in DCA-resistant cells derived from HCT-116 cells NF- κ B was constitutively activated and is partly responsible for the observed apoptosis resistance (Crowley-Weber et al., 2002). In this regard, it has been postulated that bile acid-induced colon cancer resistance could be related with Akt-dependent NF- κ B activation in H508 and HT-29 cells (Shant et al., 2009).

8. Colorectal carcinogenesis and bile acids

Attending to incidence and mortality statistics, colorectal cancer can be considered as the third most common form of cancer and the second most common cause of cancer-related death worldwide, leading to an incidence of 1,2 million new cases and 608,700 deaths estimated in 2008 (Jemal et al., 2011). Together with the inherited mutations, environmental factors are strongly involved in the development of this disease. Among them, diet and nutritional habits constitute determinant factors in the appearance of sporadic colorectal cancer. There is increasing evidence that a fat-rich diet is positively correlated with colon cancer incidence (Bernstein et al., 2011; Butler et al., 2009; Carroll, 1991). In this regard, a diet with a high content in saturated fats has been associated with elevated levels of bile acids in the colonic lumen in order to emulsify the increased levels of dietary fat (Reddy, 1981; Reddy et al., 1980). This exposition to high levels of bile acids has two important consequences. First, bile acids promote DNA damage, mainly by oxidative stress, inducing mutations that may lead to an aberrant expression of oncogenes or tumor suppressor genes. Second, the continuous exposure to high levels of bile acids would allow selective growth of a cell population resistant to their apoptotic effects. Taking into account these facts, together with several observations correlating high levels of bile acids with an increase in colon cancer, these molecules can be considered as pro-carcinogenic factors in colorectal cancer development (Bernstein et al., 2011; Bernstein et al., 2005; Debruyne et al., 2001).

In vitro studies with different colon cancer cell lines support this idea. It has been observed that low concentrations of DCA stimulate growth of Caco-2 and HT-29 cells, while high concentrations induce apoptosis, pointing out to a mechanism of cancer promotion by increasing epithelial cell turnover in the colon (Milovic et al., 2002). This proliferative effect of DCA has also been observed in H508 human colon cancer cells via transactivation of EGFR (Cheng and Raufman, 2005). Moreover, in SW480 and LoVo cells, DCA is able not only to promote cell growth, but also invasiveness by activation of β -catenin signaling (Pai et al., 2004). Taken into account these effects of bile acids in colon cancer cells, the acquisition of resistance to apoptosis induced by high concentrations of these agents seems to be another major risk factor for the appearance of colonic tumors. HCT-116 colon cancer cells have been used to obtain a cell population resistant to DCA-induced apoptosis; among them, HOMUR cells that not only show a more neoplastic phenotype compared to their parental cell line, but also exhibit resistance to other anti-carcinogenic agents, such as etoposide, cisplatin or adriamycin (Powell et al., 2006). In addition, HCT-116 cells grown in the presence of increasing concentrations of DCA yield a cell population resistant to the apoptotic effects of 0.5 mM DCA, and show increased expression of several genes that may play a role in apoptosis resistance and early stage carcinogenesis, such as *NF- κ B*, *Bcl-2* or *Grp78* among others (Crowley-Weber et al., 2002). A deeper proteomic study of these DCA-resistant cell lines revealed an altered protein expression profile, with under-expression of pro-apoptotic proteins, over-expression of anti-apoptotic proteins, and defective expression of proteins related with DNA repair and cell cycle checkpoint functions that could give rise to chromosome instability and to accelerate progression to cancer (Bernstein et al., 2004).

9. UDCA and the protective effects of bile acids

Despite all the previously mentioned cytotoxic and pro-carcinogenic effects of bile acids, there are also evidences about the

potential protective effects of some of these molecules, mainly hydrophilic bile acids as UDCA. The anti-apoptotic effects of UDCA have been demonstrated in hepatocytes and are mainly due to inhibition of ROS production (Mitsuyoshi et al., 1999; Rodrigues et al., 1998) and protection from mitochondrial permeability and release of proapoptotic factors (Rodrigues et al., 1999; Rodrigues et al., 2003). UDCA has also been related with a cytoprotective effect in colon epithelial cells, as it is able to induce differentiation and senescence in HCT-116 cells, being these effects related with changes in the structure of chromatin by histone hypoacetylation (Akare et al., 2006). Moreover, it has also been observed in these cells that the inhibition of DCA-induced apoptosis by UDCA occurs by suppression of the EGFR/Raf-1/ERK signaling pathway (Im and Martinez, 2004). However, this is not the only signaling pathway modulated by UDCA. In HCT-116 and SW480 cells, UDCA is able to inhibit the translocation of PKC isoenzymes induced by DCA, being this effect related with chemoprevention of colon carcinogenesis (Shah et al., 2005). In this regard, several reports point out the protective effect of UDCA against the development of colonic neoplasia (Serfaty et al., 2003; Tung et al., 2001), and it has been demonstrated that UDCA inhibits Ras mutations, wild-type Ras activation, and cyclooxygenase-2 expression in the AOM murine model of colon carcinogenesis, supporting its chemopreventive role (Khare et al., 2003). Finally, it has been described that pretreatment of HCT-116 cells with low concentrations of bile acids (<200 μ M DCA or CDCA) suppresses the apoptosis induced by high concentrations of DCA (>500 μ M) (Yui et al., 2009). Interestingly, treatment of HCT-116 cells with these sublethal concentrations of DCA or CDCA did not prevent cytochrome *c* release from the mitochondria into the cytosol, whereas activation of caspases was almost completely suppressed by inhibition of the association between Apaf-1 and caspase-9.

10. Conclusions

Bile acids are physiological molecules mainly involved in the correct digestion and

absorption of dietary fat. In addition, they promote the secretion of several enzymes involved in digestion, regulate cholesterol levels, show antimicrobial activity in the small intestine, and contribute to the renewal of the colonic epithelium. Despite their beneficial effects, bile acids can be considered cytotoxic molecules mainly due to the induction of oxidative stress and membrane damage as a consequence of their hydrophobicity and detergent-like activity. The selective growth of cells resistant to bile acid-induced cell death may accumulate DNA damage resulting in malignant transformation. Thus, bile acids show a dual behavior being required for a healthy gastrointestinal function but presenting cytotoxic and potential pro-carcinogenic effects.

Acknowledgements

This work was supported by grant BFU2008-04758 from the DGES (Spain).

References

- Akare, S., Jean-Louis, S., Chen, W., Wood, D.J., Powell, A.A., Martinez, J.D., 2006. Ursodeoxycholic acid modulates histone acetylation and induces differentiation and senescence. *Int J Cancer* 119, 2958-2969.
- Akare, S., Martinez, J.D., 2005. Bile acid induces hydrophobicity-dependent membrane alterations. *Biochim Biophys Acta* 1735, 59-67.
- Amaral, J.D., Viana, R.J., Ramalho, R.M., Steer, C.J., Rodrigues, C.M., 2009. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res* 50, 1721-1734.
- Andoh, A., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., 2003. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr Pharm Des* 9, 347-358.
- Araki, Y., Katoh, T., Ogawa, A., Bamba, S., Andoh, A., Koyama, S., Fujiyama, Y., Bamba, T., 2005. Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radic Biol Med* 39, 769-780.
- Barrasa, J.I., Olmo, N., Pérez-Ramos, P., Santiago-Gómez, A., Lecona, E., Turnay, J., Lizarbe, M.A., 2011. Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells. *Apoptosis* 16, 1054-1067.
- Bernstein, C., Holubec, H., Bhattacharyya, A.K., Nguyen, H., Payne, C.M., Zaitlin, B., Bernstein, H., 2011. Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Arch Toxicol*.
- Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C.M., Dvorak, K., 2009. Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 15, 3329-3340.
- Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C.M., Dvorakova, K., Garewal, H., 2005. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res* 589, 47-65.
- Bernstein, H., Payne, C.M., Kunke, K., Crowley-Weber, C.L., Waltmire, C.N., Dvorakova, K., Holubec, H., Bernstein, C., Vaillancourt, R.R., Raynes, D.A., Guerriero, V., Garewal, H., 2004. A proteomic study of resistance to deoxycholate-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 25, 681-692.
- Bhardwaj, A., Aggarwal, B.B., 2003. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 23, 317-332.
- Broker, L.E., Kruyt, F.A., Giaccone, G., 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11, 3155-3162.
- Butler, L.M., Wang, R., Koh, W.P., Stern, M.C., Yuan, J.M., Yu, M.C., 2009. Marine n-3 and saturated fatty acids in relation to risk of colorectal cancer in Singapore Chinese: a prospective study. *Int J Cancer* 124, 678-686.
- Carroll, K.K., 1991. Dietary fats and cancer. *Am J Clin Nutr* 53, 1064S-1067S.
- Cocco, T., Di Paola, M., Papa, S., Lorusso, M., 1999. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 27, 51-59.
- Crowley-Weber, C.L., Payne, C.M., Gleason-Guzman, M., Watts, G.S., Futscher, B., Waltmire, C.N., Crowley, C., Dvorakova, K., Bernstein, C., Craven, M., Garewal, H., Bernstein, H., 2002. Development and molecular characterization of HCT-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate. *Carcinogenesis* 23, 2063-2080.
- Cheng, K., Raufman, J.P., 2005. Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. *Biochem Pharmacol* 70, 1035-1047.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R., 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37, 299-310.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K., 2006. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett* 11, 506-525.

- de Bruin, E.C., Medema, J.P., 2008. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 34, 737-749.
- De Gottardi, A., Touri, F., Maurer, C.A., Perez, A., Maurhofer, O., Ventre, G., Bentzen, C.L., Niesor, E.J., Dufour, J.F., 2004. The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer. *Dig Dis Sci* 49, 982-989.
- Debruyne, P.R., Bruyneel, E.A., Li, X., Zimmer, A., Gerspach, C., Mareel, M.M., 2001. The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutat Res* 480-481, 359-369.
- Degli Esposti, M., Dive, C., 2003. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 455-461.
- Desagher, S., Martinou, J.C., 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-377.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221, 3-12.
- Glinghammar, B., Inoue, H., Rafter, J.J., 2002. Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF-kB and AP-1. *Carcinogenesis* 23, 839-845.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J., 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 72, 1493-1505.
- Gonzalez-Rubio, S., Linares, C.I., Bello, R.I., Gonzalez, R., Ferrin, G., Hidalgo, A.B., Munoz-Gomariz, E., Rodriguez, B.A., Barrera, P., Ranchal, I., Duran-Prado, M., Aguilar-Melero, P., De la Mata, M., Muntane, J., 2010. Calcium-dependent nitric oxide production is involved in the cytoprotective properties of n-acetylcysteine in glycochenodeoxycholic acid-induced cell death in hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 242, 165-172.
- Ha, Y.H., Park, D.G., 2010. Effects of DCA on Cell Cycle Proteins in Colonocytes. *J Korean Soc Coloproctol* 26, 254-259.
- Haza, A.I., Glinghammar, B., Grandien, A., Rafter, J., 2000. Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. *Nutr Cancer* 36, 79-89.
- Hong, J., Behar, J., Wands, J., Resnick, M., Wang, L.J., DeLellis, R.A., Lambeth, D., Souza, R.F., Spechler, S.J., Cao, W., 2010. Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 59, 170-180.
- Hylemon, P.B., Zhou, H., Pandak, W.M., Ren, S., Gil, G., Dent, P., 2009. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res* 50, 1509-1520.
- Im, E., Martinez, J.D., 2004. Ursodeoxycholic acid (UDCA) can inhibit deoxycholic acid (DCA)-induced apoptosis via modulation of EGFR/Raf-1/ERK signaling in human colon cancer cells. *J Nutr* 134, 483-486.
- Jean-Louis, S., Akare, S., Ali, M.A., Mash, E.A., Jr., Meuillet, E., Martinez, J.D., 2006. Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations. *J Biol Chem* 281, 14948-14960.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90.
- Kantari, C., Walczak, H., 2011. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1813, 558-563.
- Katona, B.W., Anant, S., Covey, D.F., Stenson, W.F., 2009. Characterization of enantiomeric bile acid-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *J Biol Chem* 284, 3354-3364.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M., 2003. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278, 9435-9440.
- Khare, S., Cerda, S., Wali, R.K., von Lintig, F.C., Tretiakova, M., Joseph, L., Stoiber, D., Cohen, G., Nimmagadda, K., Hart, J., Sitrin, M.D., Boss, G.R., Bissonnette, M., 2003. Ursodeoxycholic acid inhibits Ras mutations, wild-type Ras activation, and cyclooxygenase-2 expression in colon cancer. *Cancer Res* 63, 3517-3523.
- Klee, M., Pallauf, K., Alcala, S., Fleischer, A., Pimentel-Muinos, F.X., 2009. Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *EMBO J* 28, 1757-1768.
- Kure, S., Noshio, K., Baba, Y., Irahara, N., Shima, K., Ng, K., Meyerhardt, J.A., Giovannucci, E.L., Fuchs, C.S., Ogino, S., 2009. Vitamin D receptor expression is associated with PIK3CA and KRAS mutations in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 2765-2772.
- Lau, B.W., Colella, M., Ruder, W.C., Ranieri, M., Curci, S., Hofer, A.M., 2005. Deoxycholic acid activates protein kinase C and phospholipase C via increased Ca²⁺ entry at plasma membrane. *Gastroenterology* 128, 695-707.

- Longpre, J.M., Loo, G., 2008. Protection of human colon epithelial cells against deoxycholate by rottlerin. *Apoptosis* 13, 1162-1171.
- Looby, E., Long, A., Kelleher, D., Volkov, Y., 2005. Bile acid deoxycholate induces differential subcellular localisation of the PKC isoenzymes beta 1, epsilon and delta in colonic epithelial cells in a sodium butyrate insensitive manner. *Int J Cancer* 114, 887-895.
- Mahmood, Z., Shukla, Y., 2010. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 316, 887-899.
- Maran, R.R., Thomas, A., Roth, M., Sheng, Z., Esterly, N., Pinson, D., Gao, X., Zhang, Y., Ganapathy, V., Gonzalez, F.J., Guo, G.L., 2009. Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 469-477.
- Marchetti, C., Migliorati, G., Moraca, R., Riccardi, C., Nicoletti, I., Fabiani, R., Mastrandrea, V., Morozzi, G., 1997. Deoxycholic acid and SCFA-induced apoptosis in the human tumor cell-line HT-29 and possible mechanisms. *Cancer Lett* 114, 97-99.
- Milovic, V., Teller, I.C., Faust, D., Caspary, W.F., Stein, J., 2002. Effects of deoxycholate on human colon cancer cells: apoptosis or proliferation. *Eur J Clin Invest* 32, 29-34.
- Mitsuyoshi, H., Nakashima, T., Sumida, Y., Yoh, T., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Inaba, K., Sakamoto, Y., Okanoue, T., Kashima, K., 1999. Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 537-542.
- Modica, S., Murzilli, S., Salvatore, L., Schmidt, D.R., Moschetta, A., 2008. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 68, 9589-9594.
- Momoi, T., 2004. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 28, 101-105.
- Monte, M.J., Marin, J.J., Antelo, A., Vazquez-Tato, J., 2009. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 15, 804-816.
- Morgan, M.J., Liu, Z.G., 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21, 103-115.
- Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., Mak, T.W., 2008. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 532-542.
- Pai, R., Tarnawski, A.S., Tran, T., 2004. Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol Biol Cell* 15, 2156-2163.
- Palmeira, C.M., Rolo, A.P., 2004. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology* 203, 1-15.
- Parone, P.A., James, D., Martinou, J.C., 2002. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84, 105-111.
- Paumgartner, G., Beuers, U., 2002. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 36, 525-531.
- Payne, C.M., Crowley-Weber, C.L., Dvorak, K., Bernstein, C., Bernstein, H., Holubec, H., Crowley, C., Garewal, H., 2005. Mitochondrial perturbation attenuates bile acid-induced cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 21, 215-231.
- Payne, C.M., Weber, C., Crowley-Skillcorn, C., Dvorak, K., Bernstein, H., Bernstein, C., Holubec, H., Dvorakova, B., Garewal, H., 2007. Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis* 28, 215-222.
- Perez, M.J., Briz, O., 2009. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 15, 1677-1689.
- Potten, C.S., 1998. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 821-830.
- Potten, C.S., Wilson, J.W., Booth, C., 1997. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* 15, 82-93.
- Powell, A.A., Akare, S., Qi, W., Herzer, P., Jean-Louis, S., Feldman, R.A., Martinez, J.D., 2006. Resistance to ursodeoxycholic acid-induced growth arrest can also result in resistance to deoxycholic acid-induced apoptosis and increased tumorigenicity. *BMC Cancer* 6, 219.
- Powolny, A., Xu, J., Loo, G., 2001. Deoxycholate induces DNA damage and apoptosis in human colon epithelial cells expressing either mutant or wild-type p53. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 193-203.
- Qiao, D., Gaitonde, S.V., Qi, W., Martinez, J.D., 2001a. Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 22, 957-964.
- Qiao, D., Im, E., Qi, W., Martinez, J.D., 2002. Activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein mediated GADD153 expression is involved in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1583, 108-116.

- Qiao, D., Stratagouleas, E.D., Martinez, J.D., 2001b. Activation and role of mitogen-activated protein kinases in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 22, 35-41.
- Radtke, F., Clevers, H., 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307, 1904-1909.
- Rasheva, V.I., Domingos, P.M., 2009. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14, 996-1007.
- Reddy, B.S., 1981. Diet and excretion of bile acids. *Cancer Res* 41, 3766-3768.
- Reddy, B.S., Hanson, D., Mangat, S., Mathews, L., Sbaschnig, M., Sharma, C., Simi, B., 1980. Effect of high-fat, high-beef diet and of mode of cooking of beef in the diet on fecal bacterial enzymes and fecal bile acids and neutral sterols. *J Nutr* 110, 1880-1887.
- Reinehr, R., Becker, S., Keitel, V., Eberle, A., Grether-Beck, S., Haussinger, D., 2005. Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology* 129, 2009-2031.
- Renahan, A.G., Bach, S.P., Potten, C.S., 2001. The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Can J Gastroenterol* 15, 166-176.
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 405-413.
- Rodrigues, C.M., Fan, G., Wong, P.Y., Kren, B.T., Steer, C.J., 1998. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 4, 165-178.
- Rodrigues, C.M., Ma, X., Linehan-Stieers, C., Fan, G., Kren, B.T., Steer, C.J., 1999. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ* 6, 842-854.
- Rodrigues, C.M., Sola, S., Sharpe, J.C., Moura, J.J., Steer, C.J., 2003. Tauroursodeoxycholic acid prevents Bax-induced membrane perturbation and cytochrome C release in isolated mitochondria. *Biochemistry* 42, 3070-3080.
- Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Pelli, M.A., Morozzi, G., 2008. Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur J Nutr* 47, 301-309.
- Schlottman, K., Wachs, F.P., Krieg, R.C., Kullmann, F., Scholmerich, J., Rogler, G., 2000. Characterization of bile salt-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *Cancer Res* 60, 4270-4276.
- Schultz, D.R., Harrington, W.J., Jr., 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 32, 345-369.
- Serfaty, L., De Leusse, A., Rosmorduc, O., Desaint, B., Flejou, J.F., Chazouilleres, O., Poupon, R.E., Poupon, R., 2003. Ursodeoxycholic acid therapy and the risk of colorectal adenoma in patients with primary biliary cirrhosis: an observational study. *Hepatology* 38, 203-209.
- Shah, S.A., Looby, E., Volkov, Y., Long, A., Kelleher, D., 2005. Ursodeoxycholic acid inhibits translocation of protein kinase C in human colonic cancer cell lines. *Eur J Cancer* 41, 2160-2169.
- Shant, J., Cheng, K., Marasa, B.S., Wang, J.Y., Raufman, J.P., 2009. Akt-dependent NF-kappaB activation is required for bile acids to rescue colon cancer cells from stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 315, 432-450.
- Siddiqui, K.M., Chopra, D.P., 1984. Primary and long term epithelial cell cultures from human fetal normal colonic mucosa. *In Vitro* 20, 859-868.
- Soucek, K., Gajduskova, P., Brazdova, M., Hyzd'alova, M., Koci, L., Vydra, D., Trojanec, R., Pernicova, Z., Lentvorska, L., Hajdich, M., Hofmanova, J., Kozubik, A., 2010. Fetal colon cell line FHC exhibits tumorigenic phenotype, complex karyotype, and TP53 gene mutation. *Cancer Genet Cytogenet* 197, 107-116.
- Sperandio, S., de Belle, I., Bredesen, D.E., 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14376-14381.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7, 880-885.
- Tung, B.Y., Emond, M.J., Haggitt, R.C., Bronner, M.P., Kimmey, M.B., Kowdley, K.V., Brentnall, T.A., 2001. Ursodiol use is associated with lower prevalence of colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Ann Intern Med* 134, 89-95.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Zhivotovsky, B., 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15, 1153-1162.
- Velazquez, O.C., Seto, R.W., Choi, J., Zhou, D., Breen, F., Fisher, J.D., Rombeau, J.L., 1997. Butyrate inhibits deoxycholate-induced increase in colonic mucosal DNA and protein synthesis in vivo. *Dis Colon Rectum* 40, 1368-1375.

- Wachs, F.P., Krieg, R.C., Rodrigues, C.M., Messmann, H., Kullmann, F., Knuchel-Clarke, R., Scholmerich, J., Rogler, G., Schlottmann, K., 2005. Bile salt-induced apoptosis in human colon cancer cell lines involves the mitochondrial transmembrane potential but not the CD95 (Fas/Apo-1) receptor. *Int J Colorectal Dis* 20, 103-113.
- Washo-Stultz, D., Crowley-Weber, C.L., Dvorakova, K., Bernstein, C., Bernstein, H., Kunke, K., Waltmire, C.N., Garewal, H., Payne, C.M., 2002. Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis. *Cancer Lett* 177, 129-144.
- Wood, N.J., 2011. Primary biliary cirrhosis: Fenofibrate plus UDCA promising for incomplete responders to UDCA. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 63.
- Yasuda, H., Hirata, S., Inoue, K., Mashima, H., Ohnishi, H., Yoshida, M., 2007. Involvement of membrane-type bile acid receptor M-BAR/TGR5 in bile acid-induced activation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinases in gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 154-159.
- Yui, S., Kanamoto, R., Saeki, T., 2008. Deoxycholic acid can induce apoptosis in the human colon cancer cell line HCT116 in the absence of Bax. *Nutr Cancer* 60, 91-96.
- Yui, S., Kanamoto, R., Saeki, T., 2009. Biphasic regulation of cell death and survival by hydrophobic bile acids in HCT116 cells. *Nutr Cancer* 61, 374-380.
- Yui, S., Saeki, T., Kanamoto, R., Iwami, K., 2005. Characteristics of apoptosis in HCT116 colon cancer cells induced by deoxycholic acid. *J Biochem* 138, 151-157.
- Zheng, Z.Y., Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C.M., Martinez, J.D., Gerner, E.W., 1996. Bile acid activation of the gadd153 promoter and of p53-independent apoptosis: relevance to colon cancer. *Cell Death Differ* 3, 407-414.
- Zhou, J., Liu, M., Zhai, Y., Xie, W., 2008. The antiapoptotic role of pregnane X receptor in human colon cancer cells. *Mol Endocrinol* 22, 868-880.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Bile acid biosynthesis. Primary bile acids (CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid) are synthesized from cholesterol in the liver. Once in the large intestine, bacterial flora catalyzes their biotransformation into secondary bile acids. Thus, dehydroxylation of CA generates deoxycholic acid (DCA), while this reaction produces lithocholic acid (LCA) from CDCA. Finally, ursodeoxycholic acid (UDCA) derives from epimerization of CDCA.

Fig. 2. Structure of the colonic crypts. The basic functional unit of the colon is the crypt. These structures are composed by several types of cells, with different features and localizations. Thus, at the bottom of the crypts localize stem cells, undifferentiated and highly proliferative. Differentiation degree increases along the crypt, inversely correlated with the proliferative ability. Interspersed among colonocytes are found enteroendocrine and goblet cells, confined to the lower third and the middle of the crypt, respectively. Colonocytes are distributed all over the crypt, showing the most differentiated state at the top. These cells eventually undergo apoptosis allowing the renewal of the colonic epithelium.

Fig. 3. Bile acid-induced apoptosis. Bile acids are able to activate membrane-associated enzymes, such as NAD(P)H oxidases and PLA2, leading to an increased production of reactive oxygen species (ROS). On the other hand, activation of PLC by these agents can induce the endoplasmic reticulum apoptotic pathway (characterized by the release of Ca^{2+} and Bak), while membrane receptors such as EGFR or Fas trigger the extrinsic apoptotic pathway, with the subsequent activation of caspase-8. Oxidative stress promotes the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) and the release of pro-apoptotic factor to the cytosol. After the assembly of the apoptosome, caspases-9 and -3 execute the intrinsic apoptotic program. Moreover, Bcl-2 cleavage by caspases allows the formation of additional Bax-dependent pores in the mitochondrial

membrane. Finally, oxidative stress also produces genotoxic damage with the subsequent activation of transcription factors such as p53 or CHOP, promoting cell cycle arrest and, eventually, apoptosis.

Fig. 4. Bile acids signaling pathways. Bile acids induce perturbations in the plasma membrane that eventually activate several receptors and enzymes. Thus, oxidative stress induced by NAD(P)H oxidases and PLA2 leads to the activation of NF- κ B transcription factor. Production of inositol triphosphate (IP3) by PLC promotes the release of Ca²⁺ from the reticulum, and the subsequent stimulation of PKC. Moreover, bile acids are able to directly induce activation, translocation and differential subcellular localization of PKC isoforms. The bile-acid induced G-protein coupled receptor TGR5 increases AMPc levels by stimulation of adenylate cyclase (AC) followed by activation of PKA. On the other hand, tyrosine kinase receptors (RTK) such as EGFR, induce phosphorylation of the small GTPase Ras, triggering the Akt, ERK and JNK signaling pathways. Bile acids indirectly stimulate p38 MAPK through PKC activation. Finally, bile acids bind to their nuclear receptors (PXR, pregnane X receptor; FXR, farnesoid X receptor; VDR, vitamin D receptor), inducing transcriptional changes.

Table 1: Experimental models for the study of bile acid effects in colon.

MODEL	FEATURES	EFFECTS OF BILE ACIDS / REFERENCES
Caco-2	<ul style="list-style-type: none"> - Tumorigenic - Express retinoic acid binding protein I and retinol binding protein II 	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrophobicity-related membrane alterations - ROS generation - DCA activates PCK and PLC and induces apoptosis (Akare and Martinez, 2005; Araki et al., 2005; Ha and Park, 2010; Lau et al., 2005; Milovic et al., 2002; Schlottman et al., 2000; Wachs et al., 2005)
HT-29	<ul style="list-style-type: none"> - Tumorigenic - Elevated levels of p53 - myc⁺, ras⁺, myb⁺, fos⁺, sis⁺, p53⁺, abl⁺, ros⁺, src⁺, CD4⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> - Sodium butyrate and bile acids induce apoptosis - DCA and CDCA induce DNA damage (Haza et al., 2000; Katona et al., 2009; Marchetti et al., 1997; Milovic et al., 2002; Rosignoli et al., 2008; Rosignoli et al., 2001; Schlottman et al., 2000; Wachs et al., 2005; Washo-Stultz et al., 2000)
HCT-116 HCT-15	<ul style="list-style-type: none"> - Tumorigenic - Positive for transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and beta 2 (TGF beta 2) expression - Mutation in codon 13 of the ras protooncogene 	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrophobicity-related membrane alterations - Bile acids induce apoptosis - DCA induces: intracellular signaling by membrane perturbations, activation of PKC, mitochondrial and ER stress, ROS, NF-KB activation, DNA damage, activates ERK and p38, decreases p53 levels and induces GADD153 expression - Low doses of DCA can be protective (Akare and Martinez, 2005; Bernstein et al., 2004; Brossard et al., 2010; Ha and Park, 2010; Jean-Louis et al., 2006; Katona et al., 2009; LaRue et al., 2000; Longpre and Loo, 2008; Looby et al., 2005; Payne et al., 2005; Payne et al., 2007; Powell et al., 2006; Powell et al., 2001; Powolny et al., 2001; Qiao et al., 2002; Washo-Stultz et al., 2000; Yui et al., 2008, 2009; Yui et al., 2005)
SW-480 SW-620	<ul style="list-style-type: none"> - Tumorigenic - Elevated levels of p53 - Matrilysin is not expressed - Mutation in codon 12 of the ras protooncogene - myc⁺, myb⁺, ras⁺, fos⁺, sis⁺, p53⁺, abl⁺, ros⁺, src⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> - Low doses of DCA induce β-catenin activation, proliferation and invasiveness - DCA induces apoptosis (Schlottman et al., 2000; Wachs et al., 2005)
Normal colonocytes or tissue		<ul style="list-style-type: none"> - DCA and CDCA induce apoptosis and DNA damage (Garewal et al., 1996; Ha and Park, 2010; Rosignoli et al., 2008)
Tumor biopsies		<ul style="list-style-type: none"> - DCA and CDCA induce apoptosis and DNA damage - Reduced apoptosis in CRC samples compared to normal tissue (Bernstein et al., 2002; Holubec et al., 2005)
Mice		<ul style="list-style-type: none"> - DCA is carcinogenic at high-doses and long-term treatments (Bernstein et al., 2011; Modica et al., 2008)

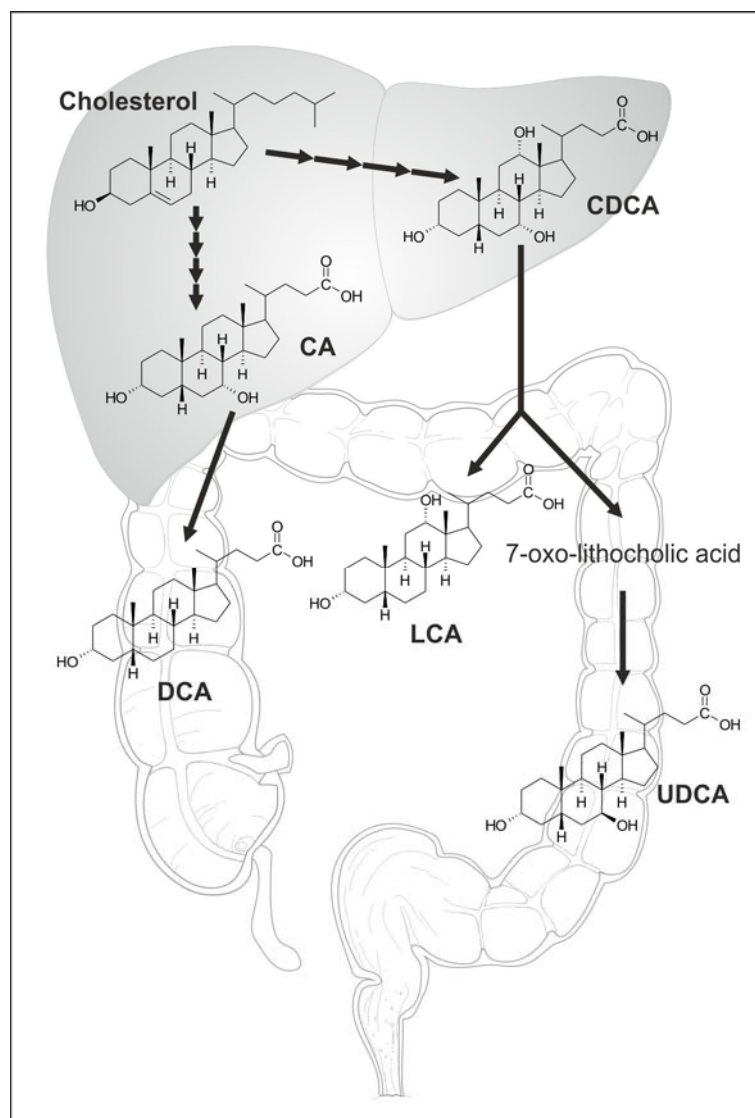


Figure 1

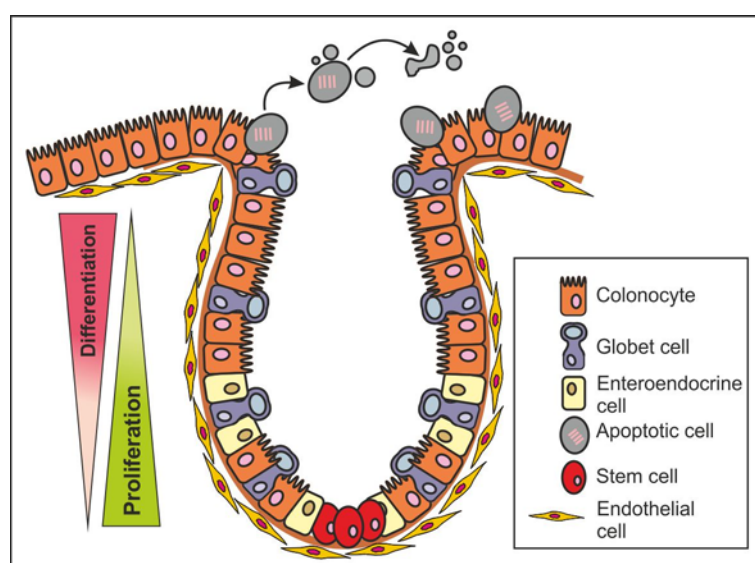


Figure 2

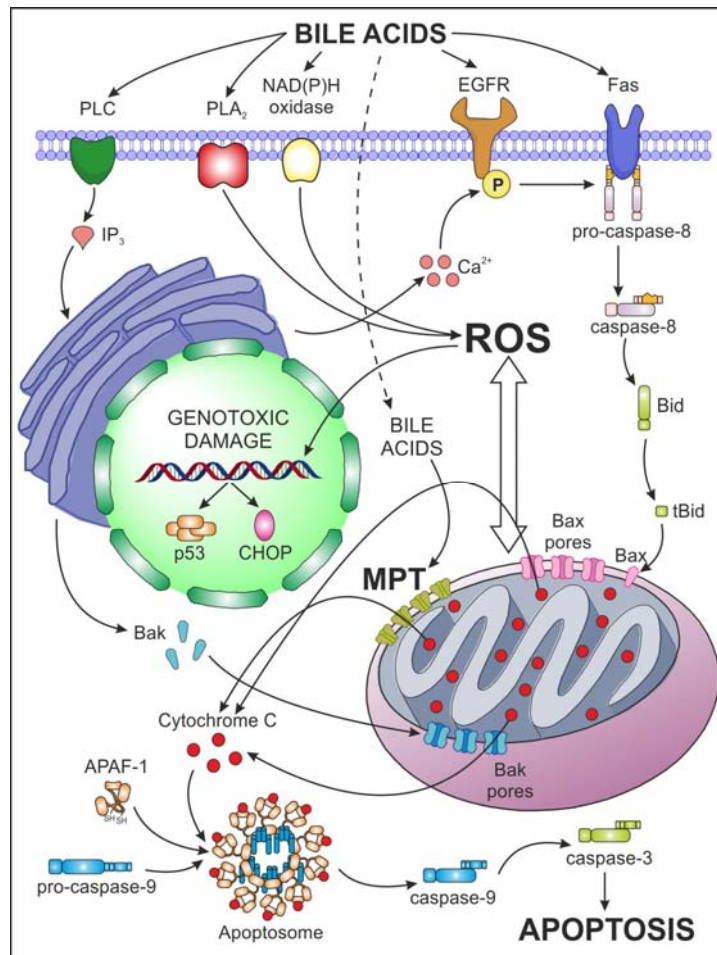


Figure 3

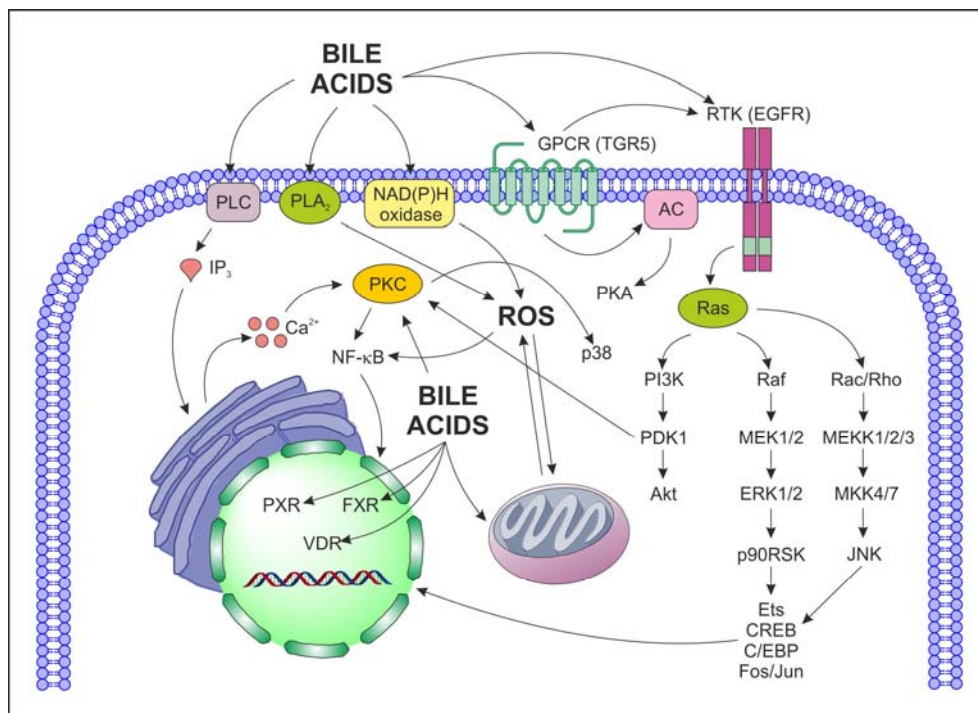


Figure 4

4.2. EFECTO DEL BUTIRATO EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO

4.2.1. Modelos de estudio para el efecto del butirato

La capacidad del butirato para inhibir la actividad HDAC se ha relacionado con sus efectos antiproliferativos y diferenciadores. Este hecho se vincula con sus propiedades antitumorales y, no en vano, derivados de este compuesto se encuentran actualmente en fase clínica de desarrollo. Pero la fisiología real del tumor no se corresponde exactamente con la observada en condiciones experimentales *in vitro*, lo que puede afectar a la efectividad de un determinado agente quimioterapéutico. Se consideró interesante abordar el establecimiento de un modelo de estudio que permitiera analizar los efectos del butirato en células de adenocarcinoma de colon humano consistente en el crecimiento en forma de esferoides multicelulares. Estos adquieren una estructura tridimensional que mimetiza la que presentan los tumores *in vivo*.

Artículo 4: Nieves Olmo, Javier Turnay, Pablo Pérez-Ramos, Emilio Lecona, **Juan I. Barrasa**, Isabel López de Silanes y M^a Antonia Lizarbe. “*In vitro* models for the study of the effect of butyrate on human colon adenocarcinoma cells.”

Toxicology in Vitro **21**:262-270 (2007).

El efecto diferenciador y antiproliferativo del butirato se ha analizado en tres líneas de adenocarcinoma de colon humano. Las células BCS-TC2 y BCS-TC2.2 son sensibles a este agente, y difieren entre ellas en que las últimas muestran tumorigenicidad intrínseca y menor grado de diferenciación que las primeras (Lopez-Conejo y col., 1996). Por otro lado, también se ha utilizado la línea celular BCS-TC2.BR2, derivada de la línea BCS-TC2 y resistente a los efectos del butirato (Lopez de Silanes y col., 2004). Las células BCS-TC2.2 derivan de los tumores obtenidos tras coinyectar las células BCS-TC2 en ratones atímicos con matrigel, extracto de basamentos membranosos (Lopez-Conejo y col., 1996). Los niveles de fosfatasa alcalina demuestran que el tratamiento con butirato induce la diferenciación de las

células BCS-TC2, ejerciendo un efecto mucho menos acusado en las células BCS-TC2.2. Las células resistentes presentan niveles basales de fosfatasa alcalina superiores a los de las células sensibles, y el tratamiento con butirato incrementa aún más el grado de diferenciación con respecto a estas. Además se han analizado los cambios promovidos por el butirato en el perfil de expresión génica de las células BCS-TC2, observándose variaciones significativas en 178 genes. De ellos 69 se sobreexpresan y 109 disminuyen su expresión, y están relacionados con la modulación del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis. Por otro lado, el cultivo de las diferentes células en superficies no adherentes ha permitido su crecimiento en forma de esferoides multicelulares. En este sentido, se ha analizado también la sublínea BCS-TC3, derivada del mismo adenocarcinoma que las anteriores pero que es capaz de formar esferoides de manera espontánea. Al volver a cultivar estas células sobre un sustrato adherente, se comprobó que los esferoides derivados de células BCS-TC2.BR2 y BCS-TC3 son muy compactos y estables, mientras que los correspondientes a células BCS-TC2 tienden a disgregarse con el tiempo y formar monocapas. El crecimiento de estos esferoides es relativamente similar en células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2, pero mucho más lento en el caso de las células BCS-TC3. Además, mientras el butirato ejerce su efecto diferenciador en esferoides de las células BCS-TC2 con la misma intensidad observada en monocapa, este efecto desaparece completamente en esferoides de las células BCS-TC2.BR2. El butirato tampoco es capaz de inducir diferenciación en esferoides de las células BCS-TC3.

Aportación personal

En el desarrollo de este trabajo se ha participado en la obtención de muestras y en el análisis y clasificación de los resultados obtenidos en los microarrays de cDNA.

Available online at www.sciencedirect.com

Toxicology in Vitro 21 (2007) 262–270

www.elsevier.com/locate/toxinvit

In vitro models for the study of the effect of butyrate on human colon adenocarcinoma cells

N. Olmo, J. Turnay, P. Pérez-Ramos, E. Lecona, J.I. Barrasa,
I. López de Silanes, M.A. Lizarbe *

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain

Received 31 March 2006; accepted 14 September 2006

Available online 29 September 2006

Abstract

The effect of butyrate has been analyzed on human colon adenocarcinoma cell lines with different properties regarding tumorigenicity, differentiation and resistance to apoptosis induced by this agent. Butyrate reduces cell proliferation, induces differentiation (according to alkaline phosphatase activity) and apoptosis, being these effects time- and concentration-dependent. The susceptibility to the cytotoxic effects of butyrate depends on the cell line considered and it is not directly related to tumorigenicity or differentiation. We show that 2 mM butyrate treatment of non-tumorigenic BCS-TC2 cells for four days strongly influences the transcriptional activity, causing extensive modification in gene expression patterns (69 up-regulated and 109 down-regulated genes). Some of these genes are involved in the modulation of cell cycle progression, apoptosis and differentiation. We have analyzed the effect of butyrate in spontaneous or induced multicellular spheroids. The more stable spheroids (spontaneous or induced from butyrate-resistant cells) increase the resistance of cells to the effects of butyrate probably due to an impaired accessibility. This *in vitro* model could be useful to study the resistance of tumors to the effect of natural regulators (i.e. butyrate) as well as to develop and test new therapeutic approaches.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Apoptosis; Butyrate; Colon adenocarcinoma; Differentiation; Multicellular spheroids

1. Introduction

The protective effect of a fiber-rich diet has been attributed in part to butyrate, a short-chain fatty acid end-product of colonic fiber fermentation, which has also been involved in protection against inflammatory bowel disease, ulcerative colitis and Crohn's disease. Butyrate not only is the preferred energy source for colonocytes but it is also the major natural regulator of the homeostasis of the normal colonic mucosa, maintaining its physical and functional integrity (Miller, 2004; Young et al., 2005). It regulates cell growth and differentiation, cation absorption, and colonic blood flow, exerting a trophic effect on non-differentiated cells at the base of the colonic crypts, while promoting dif-

ferentiation followed by apoptosis in cells at the top of the crypts (Gibson, 2004). Butyrate acts as a histone-deacetylase inhibitor (Kouraklis and Theocharis, 2006; Dashwood et al., 2006) and is able to modulate gene expression, signal transduction and protein degradation pathways. *In vitro* studies using different colorectal cell lines have demonstrated that butyrate induces cell cycle arrest, differentiation and apoptosis. In addition, it is involved in the enhancement of immunosurveillance and anti-inflammatory responses, and some derivatives are currently being clinically evaluated as antineoplastic therapeutic agents due to its cytostatic and cytotoxic effects on tumor cells.

Colorectal cancer is the third most common cancer and the second leading cause of cancer deaths. Risk factors include age, a fat- and cholesterol-rich diet, inflammatory bowel disease, and genetic predisposition. In this pathology, after transformation, the normal colorectal epithelium

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3944256; fax: +34 91 3944159.
E-mail address: lizarbe@bbm1.ucm.es (M.A. Lizarbe).

progresses through adenoma to invasive adenocarcinoma with distant metastasis. From the molecular genetic point of view the stepwise progression has been studied using tumors obtained after surgery at different stages of development (Rupnarain et al., 2004).

The most important therapeutic approach for colorectal cancer is still surgery; however, standard adjuvant or targeted therapies (chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy) are additional modalities to improve response rates and survival (Marshall and Hwang, 2005; Raju and Cruz-Correa, 2006). To study the molecular events involved in transformation, tumor progression, as well as to test new drugs, some *in vitro* conditions mimicking tumors with different malignant potential are being described. *In vitro* models for tumor therapy include cell lines established from human tumors and three-dimensional multicellular spheroids or layers that mimic the behavior of solid tumors (Grant et al., 2006; Ferrante et al., 2006; Khaitan et al., 2006).

We have developed a human colon adenocarcinoma cell-system model consisting in non-tumorigenic and tumorigenic human colon adenocarcinoma cells (Turnay et al., 1990; López-Conejo et al., 1996), and tumorigenic butyrate-resistant cells (López de Silanes et al., 2004). In addition, we describe the establishment of a cell line that spontaneously grows as multicellular spheroids and compare its behaviour with induced spheroids from the parental and butyrate-resistant cells. These established cell lines present quite different behavior in culture regarding tumorigenicity and differentiation, and constitute a good model to study the molecular mechanisms by which butyrate or other cytotoxic agents exert their effects in colon carcinoma cells.

2. Materials and methods

2.1. Cells, culture conditions and treatments

BCS-TC2 cells (parental cells) were obtained in our laboratory from a poorly differentiated human colon adenocarcinoma; they present a low differentiation degree and null tumorigenicity (Turnay et al., 1990). Co-injection of these cells with matrigel and *in vivo* passage in athymic mice allowed the establishment of the BCS-TC2.2 cell subline. These cells present intrinsic tumorigenic potential and a lower differentiation degree than the parental ones (López-Conejo et al., 1996). The continuous culture of BCS-TC2 cells in the presence of 2 mM butyrate allowed the establishment of a cell subline (BCS-TC2.BR2) that acquired resistance to the apoptotic effects of butyrate and other types of stress (López de Silanes et al., 2004).

Routinely, cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (25 mM glucose) supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum, penicillin (50 IU/ml), streptomycin (50 µg/ml) and L-glutamine (300 µg/ml). Cells were cultured at 37 °C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, and the culture medium was replaced every three days. BCS-TC2.BR2 cells were routinely main-

tained in standard growth medium in the presence of 2 mM butyrate. Cell harvesting was performed by treatment of nearly confluent cultures with 0.05% (w/v) trypsin, 0.02% (w/v) EDTA. For butyrate treatment, after trypsinization the cells were seeded and allowed to attach and grow for two days reaching the exponential growth phase; then, culture medium was replaced by new one containing the corresponding butyrate concentration for each assay and cultured for four days under these conditions.

Cells were obtained from the original human colon adenocarcinoma by the explant-culture method. From the tumor explants, small round-shaped cells, either single or aggregated, with low ability to attach to the culture substrate were isolated. The cells that adapted to monolayer growth were continuously propagated and finally allowed the establishment of the BCS-TC2 cell line (Turnay et al., 1990). On the other hand, floating cell clumps that did not attach to the culture plastic were isolated and propagation was carried out by trypsinization of the clumps. These cells maintained the non-adherent growth and grew as spontaneous multicellular spheroids even on standard culture plastic substrate, finally allowing the establishment of the BCS-TC3 cell line. Propagation of this cell line was carried out by trypsinization of the sedimented spheroids and gentle pipetting; 2–3 days afterwards, spheroid growth was again observed.

Growth as multicellular spheroids was induced in adherent cells (BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2) by seeding 10⁶ cells on non-adherent conditions: dishes (100 mm) coated with 1% (w/v) agar. Growth measurement of induced or spontaneous spheroids was started 7 days after seeding; spheroids were first diluted in culture medium and 1 spheroid was seeded per well. Growth of individual spheroids was monitored using an ocular with a grid, and their size calculated according to $(a \times b)^{1/2}$, where *a* and *b* are the largest and its perpendicular diameter, respectively.

Duplication time was determined from exponentially growing cultures according to $\log N = \log N_0 + R \cdot t$, where *N*₀ and *N* are the cell number (or average spheroid size) at time zero or at a given time (*t*), respectively, and *R* is the exponential growth rate (doubling time = $\log 2/R$).

2.2. Flow cytometry

Cells were collected by trypsinization after butyrate treatment, resuspended in 10 mM Hepes, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1.8 mM CaCl₂, and 10⁶ cells were incubated for 15 min in the presence of 2 µg/ml FITC-annexin A5. To distinguish necrotic cells, 0.005% (w/v) propidium iodide was added. Analyses were performed in a FACScan cytometer (Becton-Dickinson), as previously reported (López de Silanes et al., 2004).

2.3. Cell proliferation and alkaline phosphatase activity

Proliferation in monolayer-growing cells was determined using the MTT method (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-

diphenyltetrazolium bromide) (Pérez-Ramos et al., 2005); absorbance at 570 nm was measured (always below 1.5–1.8) and referred in each cell line to that obtained in control cultures without butyrate treatment (100%). The activity of the colonic-epithelium differentiation marker alkaline phosphatase (ALP) was measured using the commercially available Sigma diagnostics ALP10 kit (Guzmán-Aránguez et al., 2005). Protein content was determined using the D_C Protein Assay (Bio-Rad).

2.4. cDNA array analyses

Total RNA samples from BCS-TC2 cells, either untreated or treated with 2 mM butyrate for four days, were reverse-transcribed in the presence of [α - 32 P]dCTP and the radiolabeled products used to hybridize cDNA arrays (MGC arrays, 9600 genes, <http://www.grc.nia.nih.gov>), employing previously reported methodologies (López de Silanes et al., 2004). All the data were first analyzed using the Array Pro software (Media Cybernetics), then normalized by Z score transformation. Changes in gene expression between different RNA groups were then calculated and differences were expressed as Z ratio, which were considered significant when $\geq +1.5$ or ≤ -1.5 . The data reflect three independent experiments.

2.5. Statistical analysis

The differences between the mean values were analyzed with SigmaPlot v 8.02 and using Student's *t*-test; statistical significance was considered to be achieved at the $P < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Effect of butyrate on cell growth and differentiation

Cell growth in the absence of butyrate is similar in BCS-TC2 and BCS-TC2.2 cells (population doubling time around 35–40 h) whereas BCS-TC2.BR2 cells show a 1.6-fold lower population doubling time. To analyze the effect of butyrate on cell proliferation, cells were seeded in the absence of butyrate and, after 2 days, medium was replaced with butyrate-containing culture medium and allowed to grow for four days. This treatment significantly reduces cell proliferation in both parental non-tumorigenic BCS-TC2 cells and in tumorigenic BCS-TC2.2 cells in a butyrate concentration-dependent manner with a significant reduction in the cell number compared to untreated controls (Fig. 1). The effect on the tumorigenic cells is slightly lower than that observed on the non-tumorigenic ones (3.6- vs. 6.5-fold decrease at 8 mM butyrate, respectively). In addition, some morphological changes are also observed in the monolayers (i.e. increase in cell size and vacuolization, appearance of multinucleated cells, and rounding-up of cells in localized zones of the monolayer as a previous step to cell detachment); the dose-dependent reduction in cell

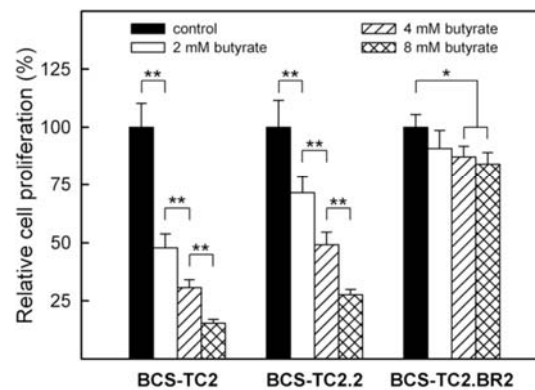


Fig. 1. Effect of butyrate on cell proliferation of human colon adenocarcinoma cells. Two days after seeding (10^4 cells/cm 2 in 24-well plates), the cell culture medium was replaced by fresh one containing 2, 4 or 8 mM butyrate and, afterwards, cells were cultured for four days. The number of viable cells was measured using the MMT method after the 4-day treatment. Absorption data at 570 nm were normalized in each cell line with the value obtained in control cultures without butyrate (100%) and represent mean values (\pm SD) of twelve different measurements from 3 independent experiments (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$).

growth is also associated to an increased number of cells that have lost its adherence to the growth surface. Butyrate-resistant cells (BCS-TC2.BR2) show only a small reduction in cell proliferation at 4 and 8 mM butyrate.

To test whether butyrate induces cell differentiation, we examined the expression of one of the best characterized intestinal markers of differentiation, ALP. As shown in Table 1, ALP activity in BCS-TC2 cells is rather low with an average value of 28 mU/mg; butyrate induces an increase in ALP activity in a concentration-dependent manner. Treatment of cells with 8 mM butyrate yields an 11-fold increase in ALP activity compared to control levels. The tumorigenic BCS-TC2.2 cells present lower basal ALP activity than the non-tumorigenic cells and, even though 8 mM butyrate treatment increases 5-fold the ALP activity, values remain quite low. A more drastic effect is observed in butyrate-resistant cells. These cells exhibit a higher differentiation degree than the parental cells as revealed by the higher basal activity of ALP and increase 15-fold their ALP activity upon 8 mM butyrate treatment.

3.2. Apoptosis induction

One of the best described effects of butyrate in different cell types is the induction of cell death via apoptosis. In fact, we have previously described that parental BCS-TC2 cells are sensitive to butyrate, which induces both differentiation and apoptosis (Navarro et al., 1997). Although butyrate induces differentiation in BCS-TC2.BR2 cells, they are resistant to its apoptotic effects (López de Silanes et al., 2004). Here we have analyzed whether the tumorigenic BCS-TC2.2 cells are sensitive or resistant to the

Table 1
Effect of butyrate on alkaline phosphatase activity in human colon adenocarcinoma cells

Cell line	Alkaline phosphatase activity (mU/mg)			
	Control	Butyrate concentration		
		2 mM	4 mM	8 mM
BCS-TC2	28.6 ± 2.3	99.6 ± 6.5	198.6 ± 9.8	320.9 ± 21.2
BCS-TC2.2	8.2 ± 0.6	25.2 ± 2.1	28.2 ± 2.6	48.6 ± 3.5
BCS-TC2.BR2	187.0 ± 9.6	689.3 ± 32.5	1300.6 ± 50.2	2860.4 ± 79.4

Exponentially growing cultures were either maintained in standard medium (control) or treated with 2, 4, or 8 mM butyrate for four days. Data represent mean values ± SD of five experiments with triplicate samples.

effects of butyrate. Apoptosis was monitored by flow cytometry using FITC-annexin A5 (Fig. 2); the percentage of apoptotic cells is shown in the lower right quadrants (propidium iodide-negative, FITC-annexin A5 positive). The percentage of apoptotic cells does not significantly change upon 2 mM butyrate treatment for four days in BCS-TC2.BR2 cells. However, a significant increase in the percentage of apoptotic cells is observed in the parental and BCS-TC2.2 cells (11.2% and 14.5%, respectively), with a parallel increase in cells showing primary or secondary necrosis (Fig. 2, upper-right quadrants). The use of higher butyrate concentrations or longer treatment times provokes higher percentages of cell death (data not shown).

3.3. Gene expression profiles in BCS-TC2 cells treated with butyrate

The gene expression profile of BCS-TC2 cells after 4 day incubation in the presence of 2 mM butyrate has been compared to that of untreated cells. The screening of 9600 genes allowed the identification of 178 genes that showed the most significant differences in expression levels: 69 up-regulated and 109 down-regulated after butyrate treatment. Table 2 shows the number of genes that alter their expression, classified according to their biological function. Among them, 27 genes are involved in cell cycle proliferation, differentiation and apoptosis.

3.4. Multicellular spheroids: a three-dimensional culture mimicking tumor growth

One approach to study tumor behavior consists in the culture of cancer cells as three-dimensional multicellular spheroids, which closely resemble the growth of tumors. Thus, we have extended our model system to this type of culture seeding BCS-TC2 and butyrate-resistant cells on a non-adhesive substrate; spheroid formation is induced under these conditions. We have also obtained a cell sub-line from the original human adenocarcinoma which is able to spontaneously grow as spheroids (BCS-TC3 cells).

BCS-TC2 multicellular spheroid formation and growth are shown in Fig. 3. The initially loose cell aggregates observed 48 h after seeding (Fig. 3A) change to more organized and compact spheroid-type structures (1–2 weeks after seeding; Fig. 3B) which are able to grow in suspension

maintaining the overall architecture throughout culture. Spheroid association is observed after long time in culture (4–5 weeks; Fig. 3C). A different behavior between BCS-TC2 spheroids and those from butyrate-resistant and BCS-TC3 cells is observed when spheroids are reseeded into adherent cell substrate. BCS-TC2 spheroids attach to the standard surface and, after 1 week, cells are observed growing out from the spheroids gradually returning to monolayer growth resembling the initial steps of an explant culture system (Fig. 3F). Moreover, in general, spheroids from BCS-TC2.BR2 (Fig. 3D) and BCS-TC3 (Fig. 3E) are more compact and stable than those from the parental cells.

3.5. Spheroid growth and effect of butyrate

Spheroid growth was monitored during 23 days using an ocular equipped with a graduated grid after seeding pre-formed spheroids on non-adherent plates (Fig. 4A). The average spheroid initial size is around 100 µm or 200 µm in induced or spontaneous spheroids, respectively. BCS-TC2 induced spheroids show the fastest growth rate, with a size-doubling time of ~6 days and reaching a maximum size around 700 µm. BCS-TC2.BR2 induced spheroids followed a similar growth pattern with a slightly higher size-doubling time (~10 days). More significant differences were found with spontaneous BCS-TC3 spheroids, which show a slower growth rate (3.5- and 2.1-fold lower than BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 spheroids) disregarding the initial spheroid size. Moreover, a lag phase with a slight decrease in diameter is observed in BCS-TC3 spheroids up to 2 days that may arise from a transition to a more compact structure in these spheroids as no release of individual cells is observed.

The differentiation degree, according to ALP activity, in cells growing in monolayer and those from spheroids is similar under standard culture conditions (Fig. 4B, black bars). The highest differentiation degree is found in spheroids obtained from butyrate-resistant cells. However, differences are found in the induction of differentiation after butyrate treatment. Butyrate increases ALP activity in BCS-TC2 spheroids in a similar way to that observed in cells growing in monolayer, but almost no activation is observed in spheroids derived from butyrate-resistant cells or in the spontaneous BCS-TC3 spheroids (Fig. 4B).

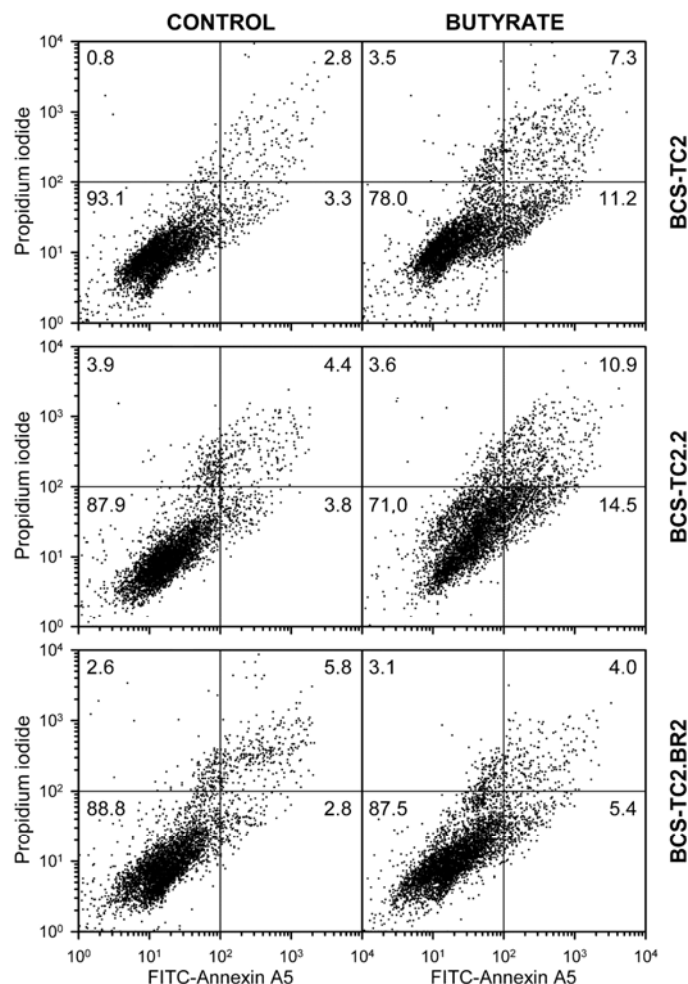


Fig. 2. Flow cytometry profiles of FITC-annexin A5 labeled cells. Apoptosis in control (left panels) and in 2 mM butyrate-treated cultures for four days (right panels) was monitored by flow cytometry after cell staining with FITC-annexin A5 and propidium iodide. The percentage of apoptotic cells corresponds to the values in the lower-right quadrants.

4. Discussion

The protective effect of dietary fiber against colorectal cancer and gastrointestinal diseases is widely accepted (Miller, 2004; Young et al., 2005; Dashwood et al., 2006). The *in vivo* normal sequence of events in the colon epithelium renewal includes proliferation from stem cells, differentiation, apoptosis and extrusion of apoptotic cells into the lumen. Butyrate induces differentiation and reduces cell proliferation in intestinal-epithelial cells through modulation of the expression of several genes. Although normal colonic cells *in vivo* are exposed to concentrations higher than 20 mM butyrate, cells in culture rarely tolerate concentrations over 10 mM. However, the susceptibility to

the cytotoxic effects of this agent depends on the cell line considered. Growth inhibition can be partially explained by the induction of the apoptotic programme triggered by the induction of cell differentiation. Colon adenocarcinoma cells are sensitive to the differentiating and apoptosis inducing effects of butyrate (Navarro et al., 1997; Schroy et al., 1994). In fact, we have observed that the parental non-tumorigenic human colon adenocarcinoma cells and their tumorigenic offspring (BCS-TC2.2 cells) decrease their proliferation rate and show an activation of the apoptotic cell death pathway. Higher butyrate concentrations or longer treatment times increase cell death via apoptosis. We have selected a 2 mM concentration and four days of treatment in order to analyze the changes associated to cell

Table 2
Differential gene expression in BCS-TC2 cells after 4 day incubation with 2 mM butyrate

Biological function	Modified genes	
	Up-regulated	Down-regulated
A. Cell cycle control and proliferation	5	11
B. Apoptosis and stress	6	5
C. Protein biosynthesis, folding and degradation	4	17
D. Transcriptional and post-transcriptional processes	8	17
E. Signal reception and transduction	12	7
F. Metabolic pathways	17	14
G. Ion channels, transport, binding and homeostasis. Intracellular membrane trafficking	9	9
H. Cytoskeleton structure and mobility. Cell-matrix interactions	2	18
I. Differentiation and development	2	4
J. Other functions	4	7
Total number of genes	69	109

Each gene appears only in one group, although several biological functions may be assigned to some genes.

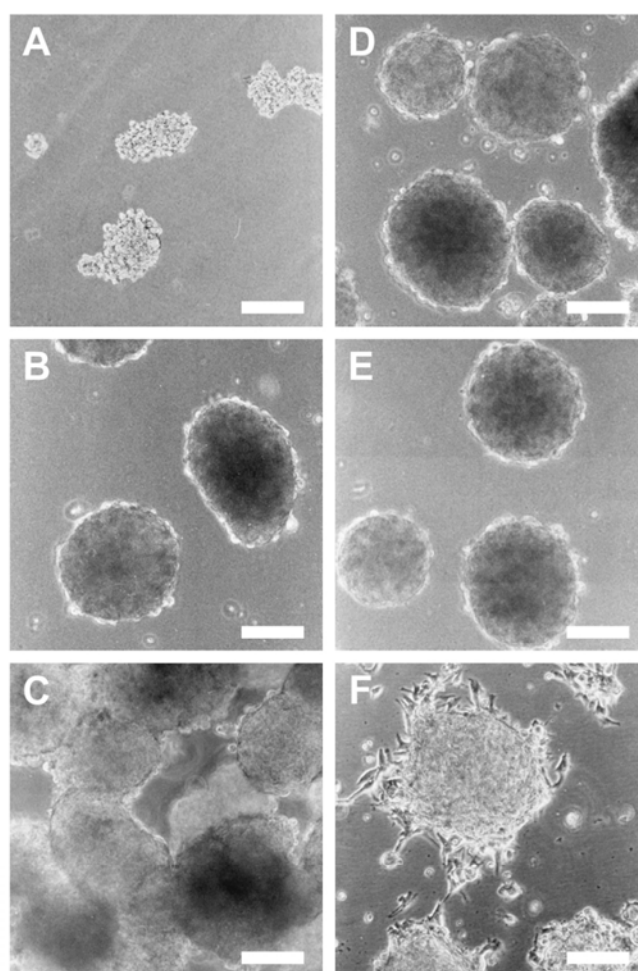


Fig. 3. Light micrographs of multicellular spheroids growing on a non-adherent surface. Representative micrographs of the spheroid formation and growth in BCS-TC2 cells: initial loose cell aggregates 48 h after seeding (A), well-rounded spheroids after 2 weeks in culture (B), spheroid association after 5 weeks in culture (C), and BCS-TC2 spheroids upon subculture onto adherent surfaces (F). BCS-TC2.BR2 induced cell spheroids (D) and spontaneous BCS-TC3 cell spheroids (E). Bar = 100 μ m.

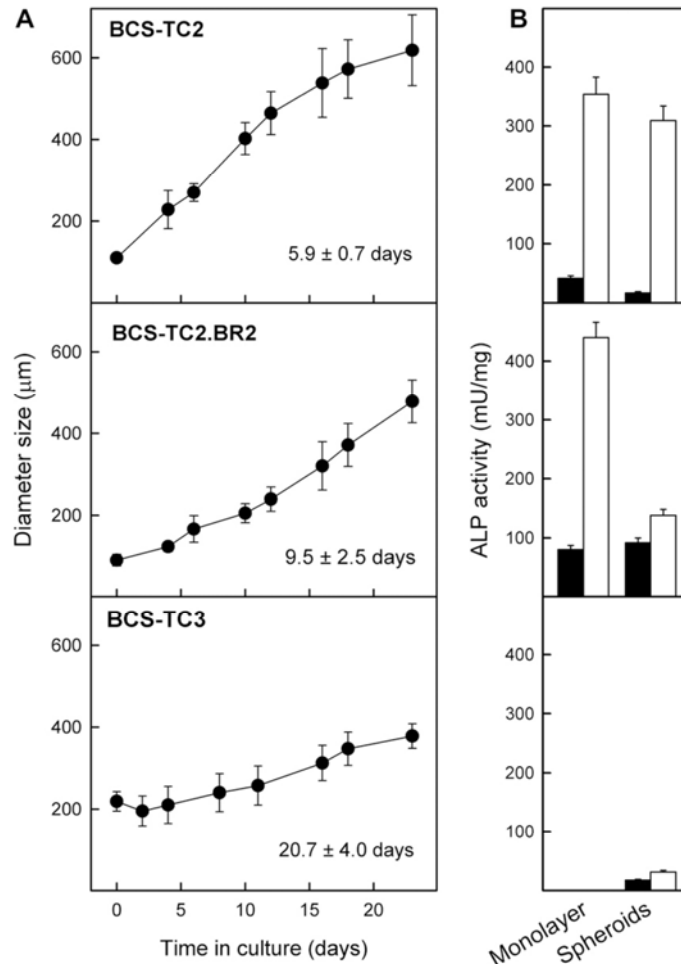


Fig. 4. Spheroid growth and effect of butyrate treatment on cell differentiation. (A) Growth of induced or spontaneous multicellular spheroids on non-adherent substratum was monitored during 23 days; the size duplication time is indicated. Data represent mean values of the diameter size of 20 individual spheroids from each cell line with a similar initial size. (B) Cells growing in monolayer (exponentially growing cells) or as spheroids (3 weeks after seeding 20–40 spheroids/ml) were incubated for four days in standard culture medium in the absence (black bars) or in the presence of 2 mM butyrate (empty bars). ALP activity data are mean values (\pm SD) from four independent experiments with cells growing in monolayer or as spheroids.

differentiation avoiding artifacts arising from cell death. On the other hand, butyrate-resistant cells not only show a higher proliferation activity when growing in the absence of butyrate, but also their growth rate is quite insensitive to this agent.

Butyrate has been shown to increase ALP levels, and thus differentiation, in several cell lines derived from human colorectal cancers. We have not found a correlation between low differentiation degree and tumorigenicity in our system; whereas tumorigenic BCS-TC2.2 cells are poorly differentiated, parental cells are non-tumorigenic and low differentiated, and butyrate-resistant cells are tumorigenic and more differentiated than the parental cells.

Thus, cell differentiation may evolve in transformed cells through different pathways than in normal colonocytes (from undifferentiated stem cells towards a secretory or absorptive phenotype). In fact, cell growth and intestinal differentiation seem to be independently regulated as described in HT-29 (Schroy et al., 1994) or Caco-2 cells (Tian and Quaroni, 1999), or as we have observed in BCS-TC2.BR2 cells, that present a higher differentiation degree than their parental cells (BCS-TC2) and proliferate faster.

Tumorigenic BCS-TC2.2 cells are sensitive to butyrate as the parental cells. Floating cells that appear in the growth medium and that are FITC-annexin A5 positive

are a sign of apoptosis. These results are in agreement with the potential role of butyrate on the regression of colon tumors, as apoptosis is involved in spontaneous tumor regression and also appears after standard therapy.

Microarray technology provides an easy overview of gene expression responses to drug treatments. The influence of butyrate on the transcriptional activity after short-term treatment and in resistant cells has been documented (López de Silanes et al., 2004; Tabuchi et al., 2002; Della Ragione et al., 2001). Provided that the molecular mechanisms responsible for these effects must be complex, histone-deacetylase inhibition appears to be the key in these changes (Kouraklis and Theocharis, 2006; Dashwood et al., 2006). In fact, it is well known that various mechanisms that regulate chromatin remodeling, including modulation of histone-deacetylase activities, are important in regulating gene expression. Analysis of the transcription profiling data allows the identification of changes in gene expression within several cellular pathways providing additional support for the notion that butyrate changes the expression of specific genes. We have detected up-regulation of several genes involved in apoptosis induction, as certain caspases or even cytochrome c, and down-regulation of genes involved in activation of the cell cycle, as cyclin-dependent kinase 7. In addition, our data are in good agreement with the increase in protein content per cell after butyrate treatment (Schroy et al., 1994) as several genes involved in protein degradation, as five different proteasome subunits, are down-regulated and genes involved in protein expression, as several transcription factors, are up-regulated. These results will provide bases for a further understanding of the molecular mechanisms of cell growth arrest, differentiation and apoptosis induced by butyrate.

New approaches to cancer therapy require the understanding of the basic mechanisms of neoplastic induction and progression and a more accurate predictive evaluation of tumor responses to a variety of therapeutic agents. Tumor microenvironment and behavior could be reproduced *in vitro* culturing cancer cells as multicellular spheroids or layers (Grantab et al., 2006; Ferrante et al., 2006; Khaitan et al., 2006). This is an appropriate model of intermediate complexity between standard 2D-mono-layer cultures and tumors. It is useful to mimic solid tumors under *in vitro* conditions and is currently being used as test system for anticancer therapy. The architectural characteristics of induced butyrate-resistant and spontaneous BCS-TC3 spheroids, more stable than those of the parental cells, suggest that cell-to-cell interactions are stronger. Thus, this type of growth further increases the resistance of these cells to the effects of butyrate probably by a restricted accessibility to cells inside the spheroids. Accordingly, it has been described that tumor cell adhesion and packing density in multicellular layers impair penetration of anticancer agents contributing to drug resistance (Grantab et al., 2006) and that compacted spheroids are more resistant to ionizing radiation than loose spheroids (Ferrante et al., 2006).

In summary, we have observed that butyrate treatment of tumorigenic and non-tumorigenic cells reduces cell proliferation, induces differentiation and apoptosis, influencing the transcriptional activity of specific genes. However, the acquisition of resistance to this luminal agent may contribute to the progression of colon cancer. The growth of cells under spheroids further increases the resistance of some cells to the effects of butyrate; the induced butyrate-resistant and spontaneous spheroids are more stable than those of the parental cells and the accessibility of butyrate is impaired. Our *in vitro* model could be useful to study the resistance of tumors to the effect of natural regulators (i.e. butyrate), and to develop and test new therapeutic approaches as well as to predict the response of a given tumor to certain drugs.

Acknowledgements

This work was supported by Spanish grants BMC2002-01407 and BFU2005-02671 from DGI.

References

- Dashwood, R.H., Myzak, M.C., Ho, E., 2006. Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis* 27, 344–349.
- Della Ragione, F., Criniti, V., Della Pietra, V., Borriello, A., Oliva, A., Indaco, S., Yamamoto, T., Zappia, V., 2001. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Letters* 499, 199–204.
- Ferrante, A., Rainaldi, G., Indovina, P., Indovina, P.L., Santini, M.T., 2006. Increased cell compaction can augment the resistance of HT-29 human colon adenocarcinoma spheroids to ionizing radiation. *International Journal of Oncology* 28, 111–118.
- Gibson, P.R., 2004. Apoptosis or necrosis-colonic epithelial cell survival. *Novartis Foundation Symposium* 263, 133–145.
- Grantab, R., Sivananthan, S., Tannock, I.F., 2006. The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells. *Cancer Research* 15, 1033–1039.
- Guzmán-Aránguez, A., Olmo, N., Turnay, J., Lecona, E., Pérez-Ramos, P., López de Silanes, I., Lizarbe, M.A., 2005. Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *Journal of Cellular Biochemistry* 94, 178–193.
- Khaitan, D.D., Chandna, S.S., Arya, M.B., Dwarakanath, B.S., 2006. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line: implications for tumor therapy. *Journal of Translational Medicine* 4, 12.
- Kouraklis, G., Theocharis, S., 2006. Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy. *Oncology Reports* 15, 489–494.
- López-Conejo, T., Olmo, N., Turnay, J., Navarro, J., Lizarbe, M.A., 1996. Characterization of tumorigenic sub-lines from a poorly tumorigenic human colon-adenocarcinoma cell line. *International Journal of Cancer* 67, 668–675.
- López de Silanes, I., Olmo, N., Turnay, J., González de Buitrago, G., Pérez-Ramos, P., Guzmán-Aránguez, A., García-Diez, M., Lecona, E., Gorospe, M., Lizarbe, M.A., 2004. Acquisition of resistance to butyrate enhances survival after stress and induces malignancy of human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Research* 64, 4593–4600.
- Marshall, J.L., Hwang, J., 2005. The impact of targeted therapy on the treatment of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* 19, 19–24.

- Miller, S.J., 2004. Cellular and physiological effects of short-chain fatty acids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 4, 839–845.
- Navarro, J.M., Olmo, N., Turnay, J., López-Conejo, M.T., Lizarbe, M.A., 1997. Differentiation of BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells by sodium butyrate: increase of 5'-nucleotidase activity. *European Journal of Clinical Investigation* 27, 620–628.
- Pérez-Ramos, P., Olmo, N., Turnay, J., Lecona, E., González de Buitrago, G., Portolés, M.T., Lizarbe, M.A., 2005. Effect of bile acids on butyrate sensitive and resistant human colon adenocarcinoma cells. *Nutrition and Cancer* 52, 208–219.
- Raju, R., Cruz-Correa, M., 2006. Chemoprevention of colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum* 49, 113–124.
- Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S., Bhoola, K., 2004. Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biological Chemistry* 385, 449–464.
- Schroy, P., Rustgi, A.K., Ikonomu, E., Liu, X.P., Polito, J., Andry, C., O'Keanne, J.C., 1994. Growth and intestinal differentiation are independently regulated in HT-29 colon cancer cells. *Journal of Cellular Physiology* 161, 111–123.
- Tabuchi, Y., Arai, Y., Kondo, T., Takeguchi, N., Asano, S., 2002. Identification of genes responsive to sodium butyrate in colon epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293, 1287–1294.
- Tian, J.Q., Quaroni, A., 1999. Dissociation between growth arrest and differentiation in Caco-2 subclone expressing high levels of sucrase. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 276, 1094–1104.
- Turnay, J., Olmo, N., Gavilanes, J.G., Benítez, J., Lizarbe, M.A., 1990. Establishment and characterization of a new human colon-adenocarcinoma cell line: BCS-TC2. *Cytotechnology* 3, 75–88.
- Young, G.P., Hu, Y., Le Leu, R.K., Nyskohus, L., 2005. Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment-gene interactions. *Molecular Nutrition and Food Research* 49, 571–584.

4.2.2. Mecanismos de regulación del promotor de la anexina A1 por butirato

La anexina A1 desempeña efectos antiinflamatorios y, además, es capaz de regular procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis. Tras comprobarse que, efectivamente, esta proteína está asociada con el grado de diferenciación en células de adenocarcinoma de colon, se propuso determinar si la regulación de los niveles de proteína se deben a cambios en la actividad transcripcional y, en ese caso, determinar los mecanismos moleculares implicados. Además, se ha considerado el efecto del tratamiento con butirato y TSA comparándolo con el observado en las células resistentes BCS-TC2.BR2.

Artículo 5: Emilio Lecona, **Juan I. Barrasa**, Nieves Olmo, Beatriz Llorente, Javier Turnay y M^a Antonia Lizarbe. “Upregulation of annexin A1 expression by butyrate in human colon adenocarcinoma cells: Role of p53, NF-Y, and p38 mitogen-activated protein kinase.”

Molecular and Cellular Biology **28(15)**:4665-4674 (2008).

El tratamiento de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 con butirato y TSA induce un incremento en la expresión de anexina A1, presentando estas últimas niveles basales superiores. Estos agentes generan a su vez un aumento en el estado de diferenciación celular no sólo en estas dos líneas celulares, sino también en las células Caco-2. Con el fin de determinar si los cambios en la expresión de anexina A1 por butirato se generan a nivel transcripcional se han cuantificado los niveles de mRNA, observándose un incremento dependiente del tiempo de tratamiento. Se han empleado diferentes construcciones del promotor de la anexina A1 para profundizar en los mecanismos implicados en esta regulación, comprobándose que el factor de transcripción p53 es importante en la expresión basal de la proteína por unión a uno de sus elementos de respuesta. En cambio, la activación por butirato depende principalmente de una caja CCAAT localizada en la región proximal del promotor. La comparación de los ensayos de luciferasa con los resultados obtenidos en los experimentos de ChIP sugieren un modelo según el cual el factor de transcripción NF-YA es capaz de interaccionar con el promotor de la anexina A1 tanto por unión directa a la caja CCAAT como, de forma indirecta, a un elemento de unión a p53 por interacción

con esta proteína. El tratamiento con butirato promueve la liberación de NF-YA del promotor, tanto de la caja CCAAT como del sitio de unión p53, lo que activa la expresión del gen. La disociación del complejo p53/NF-YA parece deberse a un incremento en el estado de acetilación de p53 tras el tratamiento con butirato. En este sentido, las células BCS-TC2.BR2 mantienen cierta unión de NF-YA al promotor a través de los sitios p53 precisamente por ser más resistentes a la inhibición de la actividad HDAC por butirato y, por tanto, la activación en la expresión del gen es menor. La salida de NF-YA de la caja CCAAT puede favorecer la posterior unión a este sitio de factores activadores como C/EBP. También se demostró que la MAPK p38 es importante en la activación por butirato dado que su inhibición disminuye la actividad transcripcional del gen. Los ensayos de *ChIP* ponen de manifiesto que la inhibición de p38 promueve la liberación de p53 del promotor, probablemente por disminución directa del estado de fosforilación de este factor de transcripción. La pérdida de la unión de p53 supone una disminución en la activación de la expresión del gen por butirato. Por tanto, p53 es fundamental tanto en la actividad basal como en la inducción del promotor de la anexina A1 por butirato. Esta capacidad activadora parece estar mediada por cooperación con otros factores de unión a cajas CCAAT, mientras que NF-YA debe liberarse de estas para facilitar la entrada de estos factores activadores. Finalmente, p38 es importante en este modelo de regulación, probablemente manteniendo el estado de fosforilación de p53 de manera que este interaccione de manera efectiva con sus elementos de unión en el promotor.

Aportación personal

La aportación personal a este trabajo incluye la obtención de muestras para los análisis de RT-PCR cuantitativa, así como experimentos de luciferasa en presencia del inhibidor de p38. Además se llevaron a cabo los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Aug. 2008, p. 4665–4674
0270-7306/08/\$08.00+0 doi:10.1128/MCB.00650-07
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 28, No. 15

Upregulation of Annexin A1 Expression by Butyrate in Human Colon Adenocarcinoma Cells: Role of p53, NF- κ B, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase[¶]

E. Lecona, J. I. Barrasa, N. Olmo, B. Llorente, J. Turnay, and M. A. Lizarbe*

Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemistry, Complutense University, Madrid 28040, Spain

Received 13 April 2007/Returned for modification 8 May 2007/Accepted 26 May 2008

Annexin A1 is a member of a phospholipid and calcium binding family of proteins; it is involved in anti-inflammation and in the regulation of differentiation, proliferation, and apoptosis. Here, we show the existence of a functional binding site for the tumor suppressor p53 near the proximal CCAAT box and the fact that the basal expression of annexin A1 in human colon adenocarcinoma cells is driven by p53 at the transcriptional level. Posttranscriptional mechanisms may also play an important role in maintaining constitutive annexin A1 expression. In addition, a p53/NF- κ B complex is detected bound to the p53 binding site on its promoter. Butyrate is a natural product of fiber degradation in the colon and a key regulator of colonic epithelium homeostasis. We show that butyrate, a class I and II histone deacetylase inhibitor, induces transcriptional activation of *annexin A1* expression correlated with differentiation. The effect of butyrate is mediated through a release of NF- κ B from the proximal CCAAT box and an enhancement of p53 binding. The interaction of p53 with the promoter is dependent on p38 MAPK activity either in the absence or in the presence of butyrate. Further, activation of p38 MAPK by this agent is required to increase *annexin A1* promoter activity and to increase protein expression.

Annexins are a family of calcium and phospholipid binding proteins, with 12 members in mammals, whose common protein core is responsible for these properties. The N terminus is variable in both length and sequence and mediates most of the differential functional activities assigned to these proteins. These functions include roles in endocytosis and exocytosis, anticoagulant activity, ion channel regulation, interaction with the cytoskeleton, cell proliferation and differentiation, and anti-inflammatory properties (10, 11).

Annexin A1 was the first member of this family to be identified. It presents an N-terminal extension of intermediate length that is subject to regulation by posttranslational modifications, such as phosphorylation, transglutamination, and limited proteolytic cleavage. The main role ascribed to annexin A1 is an anti-inflammatory activity. It was first discovered as a mediator of some of the effects of glucocorticoids through the inhibition of PLA₂ activity (21) and has been related to cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase expression (14). Additionally, an active secretion of this protein has been detected, leading to externalized annexin A1 prone to N-terminal proteolysis (31). Secreted annexin A1 inhibits neutrophil and monocyte/macrophage migration to the site of inflammation (34) and modulates T-cell activation and differentiation (5).

A role for annexin A1 in proliferation, apoptosis, and cancer has been reported (11, 32). Several studies have shown that annexin A1 expression is deregulated in several carcinomas and tumor cell lines. Its expression is downregulated, associated with decreased differentiation, in B-cell lymphomas and in

different types of solid tumors (i.e., breast, prostate, or thyroid carcinomas), suggesting that annexin A1 may be an essential component for maintenance of the normal epithelia (33, 36, 40, 45). On the other hand, increased expression of annexin A1 has also been described to occur in other types of cancer (i.e., gastric, pancreatic, or esophageal carcinomas) (1, 46, 47). In addition, an increase of annexin A1 expression with differentiation has been reported to occur in normal epithelia (37) and in different cell lines. Macrophage-like differentiation induced in U937 cells with phorbol esters is accompanied by increased annexin A1 expression, as also described to occur in A549 human lung carcinoma cells (19, 41). We have extended these observations to induction of differentiation in colon adenocarcinoma cells. Three different approaches (butyrate treatment, growth in the absence of glucose and in the presence of inosine, and postconfluent growth of Caco-2 cells) all result in an induction of annexin A1 protein expression (13).

Butyrate is a natural product derived from the degradation of dietary fiber by bacteria under anaerobic conditions in the colon. It constitutes the main energy source for colonocytes *in vivo*, regulates their proliferation, and induces their differentiation along the crypt-villus axis, leading to apoptosis induction through terminal differentiation (39). Butyrate inhibition of class I and II histone deacetylases (HDACs) is thought to be responsible for most of the actions of this agent in normal and transformed cells (7). It has been shown that HDAC inhibitors are able to selectively induce apoptosis in transformed cells more than in normal cells. In fact, several of these inhibitors, including butyrate, are currently undergoing clinical trials for the treatment of both solid and hematopoietic tumors (27). It is therefore of great interest to analyze the mechanisms of action of HDAC inhibitors, especially butyrate, as it is a natural regulator in nonpathological situations. However, it is

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemistry, Complutense University, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34 91 394 4256. Fax: 34 91 394 4159. E-mail: lizarbe@bbm1.ucm.es.

[¶] Published ahead of print on 9 June 2008.

likely that butyrate has other intracellular targets, among them the intracellular kinase signaling pathways (6, 48).

There are mainly two types of genes that are regulated by butyrate: those containing Sp1/Sp3 sites on their promoters and those containing CCAAT boxes (7, 20). *p21* is the gene more widely studied within the former group, and HDAC inhibitors transcriptionally upregulate *p21* following both p53-dependent and p53-independent mechanisms (28). These agents act through Sp1 on the *p21* promoter without modifying its binding (50). They increase local histone acetylation and recruitment of histone acetyltransferases and decrease the association of HDAC with the promoter (12). On the other hand, the knowledge about the regulation by butyrate of genes containing CCAAT boxes is scarce. In colon cancer SW620 cells, the promoter of the *MDR1* gene is activated by butyrate and trichostatin A (TSA), involving NF-Y binding to the CCAAT box (20). However, there is no information about the upstream events that lead to activation of these promoters and whether this regulation is dependent on differentiation.

We have developed a model system with a parental nontumorigenic and poorly differentiated colon adenocarcinoma cell line (BCS-TC2; parental cells) (44) and a butyrate-resistant cell line (BCS-TC2.BR2), derived from the parental cells, established after long-term culture in the presence of 2 mM butyrate. Treatment of parental cells with butyrate induces growth arrest, differentiation, and apoptosis (29). BCS-TC2.BR2 cells are resistant to apoptosis induced by different agents, including butyrate, but are still induced to differentiate upon butyrate treatment (23). Interestingly, they are tumorigenic and slightly more differentiated (23); on the basis of cDNA microarrays, *annexin A1* gene expression is upregulated in BCS-TC2.BR2 cells (30). Here, we present further evidence of the role of *annexin A1* as a differentiation marker in colon adenocarcinoma cells. We characterize its induction in both parental and butyrate-resistant cells in response to butyrate treatment as well as after treatment with TSA, a more general HDAC inhibitor. We show that *annexin A1* basal expression is mainly controlled by a functional cooperation between p53 and NF-Y and that induction by butyrate is dependent on p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatments. The establishment and characterization of the human colon adenocarcinoma BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cell lines have been previously described (23, 44). Routinely, cells were cultured at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air and were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 g/liter glucose and supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum, penicillin (50 IU/ml), streptomycin (50 µg/ml), and glutamine (300 µg/ml). BCS-TC2.BR2 cells were routinely maintained in standard growth medium in the presence of 2 mM butyrate. Cell harvesting was performed by trypsinization.

Butyrate (Sigma, Alcobendas, Spain) was prepared in standard culture medium and filter sterilized. Treatment was performed on exponentially growing cells (2 to 3 days after seeding in the absence of butyrate), which were maintained in the presence of the indicated butyrate concentrations for different times. TSA was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the cells at 0.5 µM. The specific p38 MAPK inhibitor SB203580 (Sigma) was also dissolved in DMSO and used at different concentrations. Samples containing the same volume of DMSO added into the culture medium were used as controls of TSA or SB203580 treatments.

Antibodies. The primary mouse monoclonal antibodies anti-human p53 (Sigma), AnxA1 (DSHB, Iowa, IA), lamin B1 (MBL, Woburn, MA), and vinculin (hVIN1, Sigma) and rabbit polyclonal antibodies anti-human NF-YA (Santa

Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), and p38 MAPK (Cell Signaling, Danvers, MA) were used in Western blot and chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses. Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G was from Bio-Rad and peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G from Pierce (Bonn, Germany). For flow cytometry, R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; PharMingen/BD Biosciences) monoclonal antibody was used.

Western blot analysis. Total cell protein extracts were obtained by solubilization of the monolayers in 10 mM Tris, pH 8.0, containing 140 mM NaCl, 2% (vol/vol) Triton X-100, and protease and phosphatase inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 1 mM pepstatin A, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM β-glycerophosphate, and 1 mM dithiothreitol). Nuclear extracts were obtained as follows: harvested cells (20 × 10⁶ to 30 × 10⁶) were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in 180 µl of ice-cold hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA containing protease and phosphatase inhibitors), and incubated on ice for 10 min, followed by addition of 20 µl of Nonidet P-40; after 3 min at room temperature, cells were vortexed and the cytosolic fraction was obtained by centrifugation for 5 min at 2,500 × g. The nuclear pellet was resuspended in 60 µl of high-salt-concentration extraction buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA containing protease and phosphatase inhibitors) and incubated with shaking at 4°C for 1 h. The nuclear extract was centrifuged for 5 min at 16,000 × g and the supernatant stored at -80°C. Protein concentration was determined using the Bradford assay.

Total cell or nuclear protein extracts (20 µg protein) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis after heat denaturing in the presence of 5% β-mercaptoethanol. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and analyzed by Western blotting as described elsewhere (13). Development was performed using the Amersham ECL Western blot system (GE Healthcare, Barcelona, Spain). Films were scanned, and a densitometric analysis was performed to obtain volumograms on a photodocumentation system from UVItce (Cambridge, United Kingdom), using UVIBand version 97 software. Data were normalized against the intensities of the bands corresponding to vinculin (total extracts) or lamin B1 (nuclear extracts) as controls for even protein loading.

Quantitative real-time reverse transcription-PCR. Total RNA was purified from cell cultures by using an RNeasy kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. Each RNA sample was reverse transcribed into cDNAs by using a high-capacity reverse transcription kit from Applied Biosystems (Alcobendas, Spain). *Annexin A1* mRNA expression was quantified using a QuantiTect Sybr green PCR kit and a human ANXA1 SG QuantiTect primer assay (QT00078197), both from Qiagen (Hilden, Germany), in a 7900HT fast real-time PCR system from Applied Biosystems. The real-time PCR thermal conditions were 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min each. The relative real-time PCR quantification was based on the ΔΔC_T method, using the GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene as a reference endogenous gene.

Analysis of colonic-epithelium differentiation markers. Alkaline phosphatase activity was measured in cell extracts obtained as previously described (29), using a commercially available kit (Spinreact, Barcelona, Spain). One unit of enzyme activity is defined as 1 µmol of substrate hydrolyzed per minute at 37°C. DPP-IV (or CD26) was determined by fluorescence-activated cell sorting analysis; cells untreated or treated with 4 mM butyrate for 48 h were detached by trypsinization and allowed to recover for 30 min in complete culture medium. After being washed twice with PBS, 5 × 10⁵ cells were resuspended in 500 µl PBS containing 0.1% bovine serum albumin. After addition of 10 µl of the appropriate dilution of R-phycoerythrin-conjugated anti-DPP-IV antibody, the cell suspension was incubated for 1 h at 37°C in the dark. Cells were again washed twice with PBS containing 0.1% bovine serum albumin and finally resuspended in 500 µl and analyzed with a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA), as described previously (13, 22).

Luciferase reporter assay. One microgram of DNA was transfected into exponentially growing cells in 24-well plates with Escort IV (Sigma). After 20 h, the medium was replaced by fresh medium containing butyrate or TSA. After 24 h of treatment, cells were lysed and luciferase activity was measured with a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold, Germany), using the luciferase reporter gene assay from Roche (Mannheim, Germany).

For dual luciferase assays, 500 ng of the indicated plasmid was transfected together with 500 ng pRL-thymidine kinase (Promega, Alcobendas, Spain) into exponentially growing cells in 24-well plates with Escort IV (Sigma). After 20 h, the medium was replaced by fresh medium and further incubated for 24 h. Firefly and *Renilla* luciferase activities present in cellular lysates were assayed using the dual luciferase reporter system (Promega). Firefly luciferase data were normal-

ized for the corresponding transfection efficiency by using the *Renilla* luciferase activity of each sample.

Plasmids containing different fragments of the promoter region of *annexin A1* cloned into pGL3-Luc (Promega) were kindly provided by M^a Pilar Fernández (A1H-1 and A1H-3) and S. E. Moss (Ax1.2 and Ax1.3) (9). Construct A1H-5 was obtained as follows: first, the EcoRI/HindIII fragment from A1H-1 was cloned into the pUC19 plasmid, and then, the RsaI/HindIII fragment from this construct was cloned into the SmaI/HindIII sites of pGL3-Luc. Construct A1H-6 was obtained by cloning of the DraI/HindIII fragment of A1H-1 into the SmaI/HindIII sites of pGL3-Luc. The identities of the final constructs were verified by restriction digestion and DNA sequencing (Genomics and Proteomics Center from the Complutense University of Madrid).

ChIP. ChIP procedures were performed according to reference 38. Briefly, isolated nuclei from formaldehyde-cross-linked cell cultures were lysed and the cross-linked chromatin was sonicated to yield fragments of around 300 bp. Diluted soluble chromatin fragments were precleared with blocked protein G Dynabeads (Invitrogen, Barcelona, Spain) to discard nonspecifically bound chromatin fragments. Immunofractionation of complexes was carried out by adding 2 µg of the corresponding antibodies (anti-p53 or anti-NF-YA) to aliquots containing 50 µg DNA each. The immunocomplexes were recovered by centrifugation after adding blocked protein G Dynabeads and extensively washed. An aliquot of the cross-linked chromatin was treated as described above, but in the absence of the antibody (the n.a. fraction), and the first supernatant, after the immunoprecipitation, was saved as the input fraction. Immunoselected chromatin was eluted, and the formaldehyde cross-linking was reverted. The DNA from all samples was purified with a PCR purification kit (Sigma) and used for PCR analysis using specific primer pairs. PCR fragments were size fractionated by 2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and analyzed with a photodocumentation system from UVitec.

Protein immunoprecipitation. Samples containing 100 µg of nuclear proteins were incubated with 5 µl antibody against NF-YA for 20 h at 4°C. Protein A-Sepharose CL-4B (50 µl; GE Healthcare) was added, and a 4-h incubation at 4°C was carried out. Immunoprecipitated material was washed four times in PBS, and proteins were eluted from the Sepharose beads. Detection was performed by Western blotting as described above, using the primary mouse monoclonal anti-human p53 or rabbit polyclonal anti-human NF-YA antibodies.

Other procedures. The differences between the mean values were analyzed using SigmaPlot version 9.01 and SigmaStat version 3.11 (Systat Software, Erkrath, Germany) and using Student's *t* test (two-tailed). Statistical significance was considered to be achieved at *P* values of <0.05.

Prediction of the p53 binding sequence in the *annexin A1* promoter was carried out using the p53MH program (16) and MatInspector version 7.7.3 with library version 7.0 (4).

RESULTS

Effect of butyrate and TSA on annexin A1 expression and cell differentiation. Treatment of BCS-TC2 cells with 4 mM butyrate increased annexin A1 protein levels in a time-dependent manner up to ~5-fold at 96 h (Fig. 1A). Resistant cells presented slightly higher annexin A1 basal levels than parental cells (1.5- to 2-fold higher) and also showed an increase in annexin A1 levels after treatment with butyrate, but to a lower extent (1.8-fold at 96 h) than the parental ones (Fig. 1A). In order to assess if this effect was mediated through HDAC inhibition, cells were treated with TSA. Figure 1B shows the increase (~2-fold at 48 h) induced in annexin A1 protein level by 0.5 µM TSA in both cell lines. The same concentration of DMSO employed in TSA treatments was used as a control in these experiments. Control cells did not show variations in annexin A1 levels in culture for up to 96 h in the absence of DMSO or 48 h in its presence, and thus, only time zero controls are shown.

Annexin A1 mRNA levels have been analyzed by quantitative real-time reverse transcription-PCR (Fig. 1C). BCS-TC2.BR2 cells express 1.6-fold-higher basal mRNA levels than their parental cells. Butyrate induces an increase in mRNA levels in both cell lines (around threefold compared to those of

the corresponding controls) prior to the effect detected at the protein level. TSA treatment also induces mRNA expression, but to a lower extent, in both cell lines.

In addition to the increase in annexin A1 expression in colon adenocarcinoma cells (Fig. 2A), butyrate induces differentiation, as observed from alkaline phosphatase activity values (Fig. 2B), not only in BCS-TC2 cells but also in the butyrate-resistant cell line and in other cell lines, such as Caco-2 (28-, 18-, and 5-fold, respectively, after 48 h of treatment with 4 mM butyrate). The cell surface expression levels of the epithelial cell differentiation marker DPP-IV are also increased in the three cell lines (Fig. 2C).

Effect of butyrate and TSA on annexin A1 promoter activity. Several fragments from the *annexin A1* promoter controlling the expression of firefly luciferase, together with a control plasmid with a strong promoter controlling the expression of *Renilla* luciferase, were transfected into BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells. Figure 3A shows a schematic representation of the promoter fragments used with indication of the potential binding sites for transcription factors, as deduced from the *annexin A1* promoter sequence analysis and those described in the literature.

Basal activity of A1H-1 promoter fragment was threefold higher in BCS-TC2 cells than in BCS-TC2.BR2 cells (Fig. 3B), whereas annexin A1 levels were slightly higher in the latter (Fig. 1). Thus, posttranscriptional mechanisms must exist to yield this increased protein level in resistant cells. Promoter activity in BCS-TC2.BR2 cells did not vary significantly when the -911/-38 region was deleted (A1H-6). When this fragment in BCS-TC2 cells was assayed, luciferase activity decreased, yielding promoter activity values similar to those obtained with butyrate-resistant cells; this result suggests that this is the minimal activity of this promoter in both cell lines. Repressor elements must exist in the -911/-172 region, as its deletion (Ax1.3) increases luciferase activity in both cell lines. In addition, the putative p53 binding site activates transcription, as deletion of the -172/-95 sequence (A1H-5) significantly decreased luminescence below that of the Ax1.3 fragment (Fig. 3B).

Treatment of both cell lines with 4 mM butyrate or 0.5 µM TSA increased the transcriptional activities of the *annexin A1* promoter fragments to different extents (Fig. 3C). In BCS-TC2 cells, the effect of butyrate was greater than that of TSA, while the opposite was true for BCS-TC2.BR2 cells (except in A1H-6). In addition, the effect induced by butyrate was around twofold higher in BCS-TC2 cells than in butyrate-resistant cells whereas the effect of TSA was significantly higher in the latter. The removal of the upstream -911/-396 region (A1H-3) had no effect on the activation induced by butyrate or TSA on both cell lines; however, removal of the -396/-318 and -172/-95 regions further enhanced the activation induced by HDAC inhibitors. Interestingly, the latter region contains a p53 binding site whereas no binding site for already described transcription factors was predicted or has been reported to occur in the -396/-318 region. On the other hand, two regions (-318/-172 and -95/-38), both containing a CCAAT box, seem to play a role in the activation. The effect of the proximal box (located inside a putative butyrate response element) (Fig. 4A) was greater than that of the distal one; deletion of the proximal region reduced the activation induced by butyrate to values below those obtained with the A1H-1 fragment in BCS-TC2

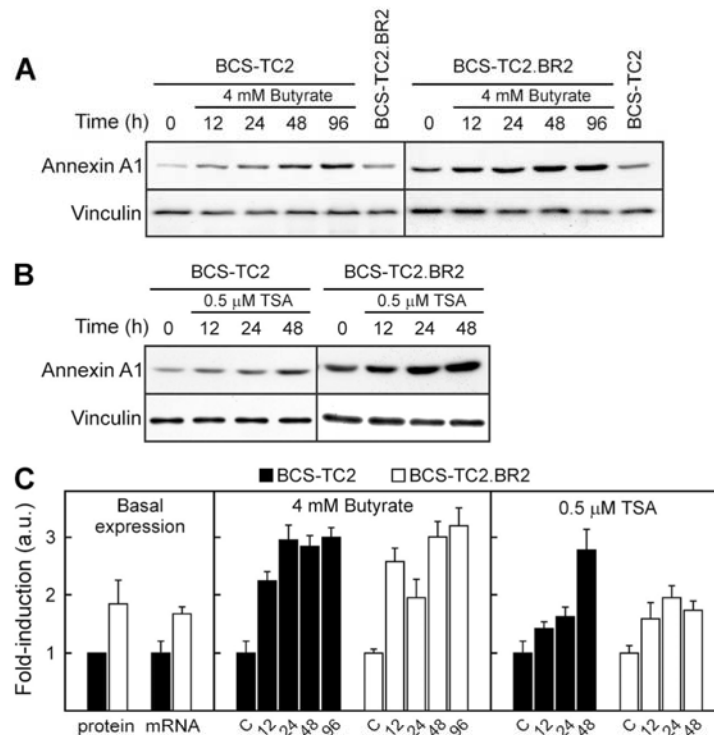


FIG. 1. Western blot and quantitative real-time reverse transcription-PCR analyses of annexin A1 expression. (A) The effects of 4 mM butyrate treatment for different times in BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells were analyzed. The basal expression level of both cell lines is included in the same blots for comparison; controls (0) did not vary with time in culture (not shown). Vinculin expression was analyzed as a control for equal protein loading and used to normalize data. (B) Effect of 0.5 μ M TSA treatment. Representative blots from four independent experiments are shown. (C) Quantitative real-time reverse transcription-PCR was carried out after treatment of cells with 4 mM butyrate and 0.5 μ M TSA for different periods of time. Data are normalized to levels for GAPDH as an internal control, and a value of 1 is assigned to the corresponding untreated control in each cell line. The left panel shows a comparison of basal protein and mRNA expression levels in both cell lines, in reference to BCS-TC2 cell levels. Data represent mean values (\pm standard deviations [SD]) for four different experiments. a.u., arbitrary units.

cells, while in BCS-TC2.BR2 cells, this reduction was smaller, with an activation similar to that observed with the A1H-1 fragment (Fig. 3C). As a whole, these data suggest that a CCAAT-binding transcription factor and p53 could be involved in promoter regulation by HDAC inhibitors.

NF-Y and p53 bind to the annexin A1 promoter. p53MH and MatInspector predictions indicate the existence of p53 and NF-Y binding sites close to each other on the *annexin A1* promoter. Binding of both transcription factors was seen by electrophoretic mobility shift and supershift assays, employing different oligonucleotides within this region (data not shown). In order to confirm the relevance of these observations in vivo, ChIP assays using specific antibodies were performed. These results show that p53 binds to the sequence remarked upon in Fig. 4A and that NF-Y binds to the proximal CCAAT box in BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells in the absence of butyrate (Fig. 4B). Whereas p53 bound only directly to its site, the NF-YA subunit was detected bound to the CCAAT box and to the p53 site as well, indicating that a complex between p53 and

NF-Y (at least the NF-YA subunit) might be also indirectly recruiting NF-Y to the *annexin A1* promoter.

In both cell lines, butyrate treatment (24 h, 4 mM) strongly decreased direct NF-Y binding to the CCAAT box in the *annexin A1* promoter. However, in BCS-TC2.BR2 cells, NF-YA still indirectly binds to the promoter through the p53 binding site. Additionally, butyrate induces an increased level of p53 binding to the *annexin A1* promoter in parental and resistant cells.

p53 and NF-YA protein expression and immunoprecipitation studies. Western blot analysis reveals that butyrate and TSA treatments induced a reduction in NF-YA protein expression in BCS-TC2 cells in both nuclear and whole-cell extracts (Fig. 5A). Resistant cells present slightly higher basal NF-YA levels than their parental cells, and the reductions in expression in response to both agents were smaller. In contrast, p53 protein expression abruptly decreased in parental cells (5.0- and 7.2-fold decreases induced by butyrate and TSA, respectively, in nuclear extracts), while the effects were much less pronounced in the BCS-TC2.BR2 cell line (around 2-fold with

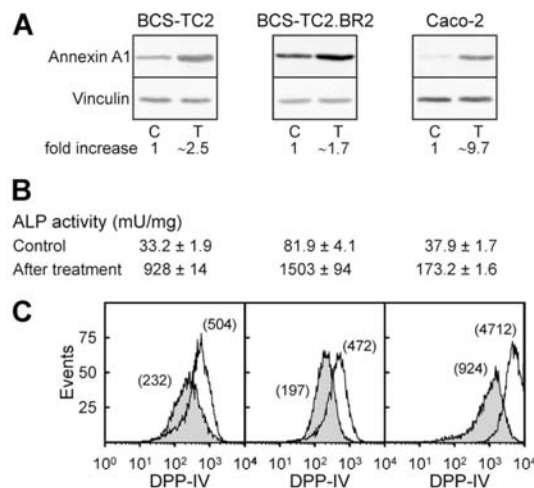


FIG. 2. Induction of differentiation markers in human colon adenocarcinoma cells after butyrate treatment. Cells were incubated in the presence or absence (control) of 4 mM butyrate for 48 h; afterwards, annexin A1 protein expression was analyzed by Western blotting (A), alkaline phosphatase activity by measuring the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate (B), and DPP-IV surface expression by flow cytometry (C). Blots in panel A and histograms in panel C are representative of four independent experiments; data in panel B correspond to mean values (\pm SD) for three independent experiments with quadruplicate samples. C, control; T, treated cells.

both agents). Basal p53 expression was also slightly higher in resistant cells (1.5-fold in nuclear extracts).

ChIP assays indicated that p53 and NF-YA presented cooperative binding to DNA. Thus, we analyzed whether these proteins interacted in nuclear extracts from both cell lines by immunoprecipitation using anti-NF-YA antibodies. Figure 5B shows that p53 was detected in the immunoprecipitated material from parental and resistant cells while no protein was detected in the absence of specific antibody. Even though BCS-TC2 cells showed lower p53 protein levels in the nuclear extracts, coimmunoprecipitation with NF-YA yielded a much stronger band than that in butyrate-resistant cells. Butyrate or TSA treatments induced a significant decrease in the amount of p53 immunoprecipitated with NF-YA subunit antibodies in parallel with the decrease in protein levels in the nuclear extracts.

Involvement of the p38 MAPK pathway in annexin A1 regulation. Figure 6A shows that butyrate increased phosphorylation of p38 MAPK in both parental and resistant cells without any change in total protein expression. Incubation with 25 μ M SB203580 (a specific p38 MAPK inhibitor) effectively blocked butyrate-induced activation of p38 MAPK (Fig. 6B); in accordance with this inhibition, annexin A1 protein overexpression was prevented even at lower concentrations of the p38 MAPK inhibitor (Fig. 6B and C), with this effect more clearly observed in BCS-TC2 cells than in the butyrate-resistant ones.

Luciferase experiments showed that the activation of the

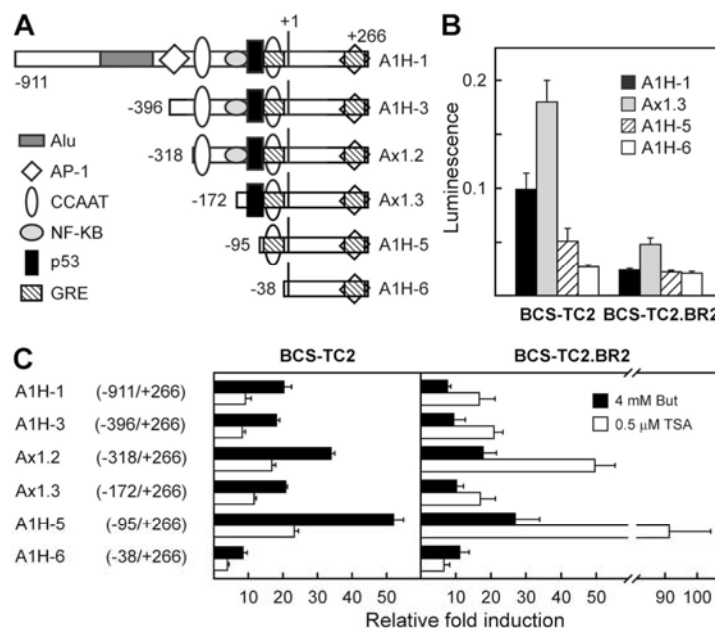


FIG. 3. Basal *annexin A1* promoter activities and effects of butyrate and TSA treatments. (A) Scheme of the different *annexin A1* promoter fragments employed in luciferase assays showing the binding sites for transcription factors relative to the transcription start position (+1). GRE, glucocorticoid response element. (B) Promoter activities of the A1H-1, Ax1.3, A1H-5, and A1H-6 constructs in BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells measured with dual luciferase assays in exponentially growing cells. (C) Effects of treatment with butyrate or TSA for 24 h on the luciferase activities of different fragments of the *annexin A1* promoter in BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells. Luciferase activities are expressed as relative induction levels, with the corresponding untreated cells used as a control. Data correspond to mean values (\pm SD) for three independent experiments performed with triplicate samples.

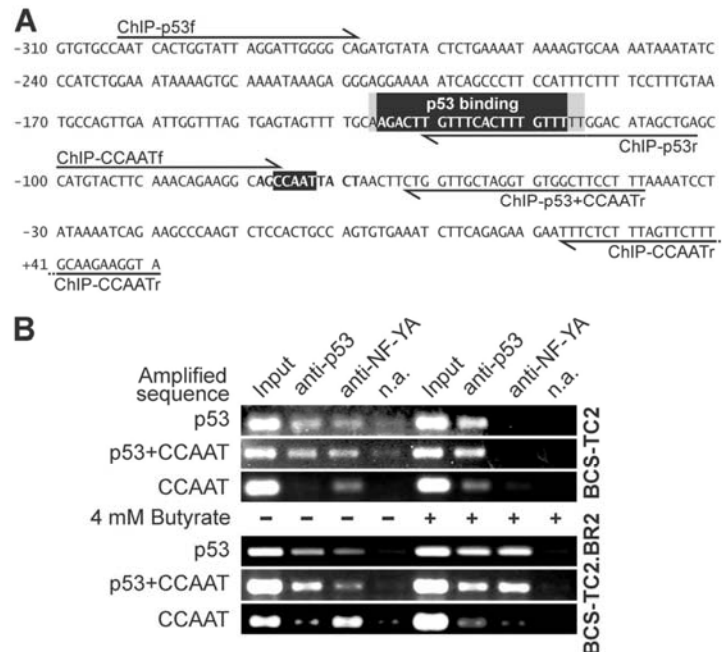


FIG. 4. ChIP assay of the *annexin A1* promoter at the p53 binding site and the proximal CCAAT box. (A) Partial sequence of the *annexin A1* promoter region (-310 to +51) showing the p53 binding site (reverse shading, positions -136 to -117, according to the p53MH program; gray shading, additional bases included in the MatInspector prediction) and the proximal CCAAT box (reverse shading, positions -77 to -73). The primers used for PCR amplification of the p53 (ChIP-p53f and ChIP-p53r), p53 plus NF-Y (ChIP-p53f and ChIP-p53+CCAATr), and NF-Y (ChIP-CCAATf and ChIP-CCAATr) binding regions are indicated. (B) Binding of p53 and NF-Y transcription factors to the *annexin A1* gene in cells without butyrate (-) or after a 24-h treatment with 4 mM butyrate (+) was studied using antibodies against p53 and NF-YA. The immunoprecipitated samples were analyzed by PCR using the primers given in panel A. As controls for the ChIP experiment, PCR was also carried out with the supernatant of a mock immunoprecipitation without antibodies (Input; diluted 1:100) and with samples obtained under these no-antibody conditions (n.a.).

annexin A1 promoter (A1H-1 fragment) by butyrate was significantly reduced in both BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells in the presence of the p38 MAPK inhibitor (Fig. 7A). ChIP assays showed that p53 binding to the *annexin A1* promoter is blocked in the presence of SB203580 either in the absence or in the presence of butyrate and in both cell lines (Fig. 7B). NF-Y direct binding to the CCAAT box was unaffected by inhibition of p38 MAPK; butyrate treatment induced reduction of NF-Y binding in a manner similar to that observed in the absence of SB203580 (Fig. 4B and 7B).

DISCUSSION

Annexin A1 function has been mainly ascribed to the modulation of immune response, but there is growing evidence for the involvement of this protein in proliferation, differentiation, and apoptosis (11). Despite its wide tissue distribution and the role of annexin A1 in crucial cellular events, very little is known about the regulation of its expression. Its induction by glucocorticoids still remains a controversial issue, but it has been shown that the putative glucocorticoid response element on the *annexin A1* promoter does not mediate this induction (41). It has also been described that phorbol esters and interleukin 6 upregulate annexin A1 protein levels through transcriptional

mechanisms involving C/EBP- β (42). Regarding the effect of HDAC inhibitors on the expression of annexin A1, there is only one recent report, to our knowledge, on the effect of the cyclopeptide FR235222 on the annexin A1 protein levels in leukemia cells (35) and one reporting the effect of decapeptide (FK228), which induces annexin A1 mRNA through an increase in histone acetylation and recruitment of C/EBP- α to the *annexin A1* promoter, specifically in AML1/ETO-positive acute myeloblastic leukemia cell lines (43). However, no studies have been reported to date on the effect of butyrate (the main natural modulator of colonic epithelium homeostasis) on the expression of this annexin. Here, we describe how butyrate regulates *annexin A1* transcription and protein expression through the activation of the p38 MAPK pathway and the involvement of p53 and NF-Y in this process.

To gain insight into the regulation of *annexin A1* gene expression, we analyzed the basal activity of this promoter. According to luciferase, electrophoretic mobility shift, and ChIP assays, p53 activates *annexin A1* expression through its binding site upstream of the proximal CCAAT box. In BCS-TC2 cells, p53 is mutated in one allele, leading to its accumulation; this mutant form (R282W) does not impair transcriptional activity of wild-type p53 (25), and therefore, a high level of annexin A1

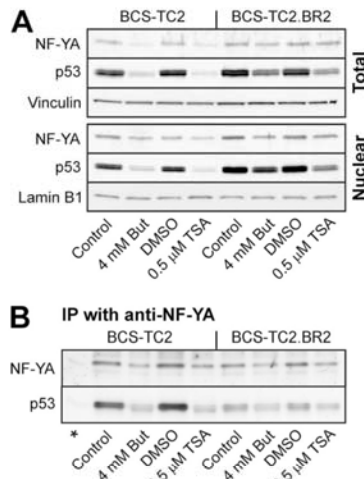


FIG. 5. NF-YA and p53 protein expression and interaction. (A) Western blot analyses for NF-YA and p53 were carried out using total or nuclear cell extracts from BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells treated with butyrate or TSA for 24 h. Blots using anti-lamin B1 and anti-vinculin were used as loading controls in nuclear and total extracts, respectively. (B) Immunoprecipitated (IP) material with antibodies against NF-YA in nuclear extracts from BCS-TC2 or BCS-TC2.BR2 cells was probed for the presence of NF-YA and p53 by Western blot analysis with the corresponding antibodies. An immunoprecipitation-negative control without specific antibodies is included (*). Representative blots from four independent experiments are shown.

expression is induced. Caco-2 cells show a much lower basal annexin A1 expression than BCS-TC2 or BCS-TC2.BR2 cells (13); this difference could arise from the occurrence of a truncated, inactive form of p53 in Caco-2 cells (8). Thus, this regulation is found to have great importance when annexin A1 expression in cancer cells is considered, as an aberrant upregulation of this annexin could be secondary to alterations in p53. Additionally, posttranscriptional mechanisms must take place in BCS-TC2.BR2 cells to obtain higher annexin A1 levels than those in parental cells. These mechanisms add further complexity to the regulation of the expression of this protein.

In contrast to basal activity, luciferase assays suggest that *annexin A1* promoter activation by butyrate depends on CCAAT boxes, mainly the proximal one. Several genes involved in growth, apoptosis, and differentiation have been shown to be upregulated in response to HDAC inhibitors through NF-Y binding to CCAAT boxes (15, 17, 20). In addition, postconfluent, spontaneous differentiation of Caco-2 cells has revealed that NF-Y is essential for the expression of several differentiation markers (3). All these data suggest a role for the NF-Y transcription factor as a mediator of butyrate and TSA actions as well as in cell differentiation.

However, in vitro luciferase data are in apparent contradiction to in vivo ChIP results regarding the role of NF-Y and p53 in promoter activity regulation. For BCS-TC2 cells, in vitro assays support an inhibitory role for p53 in NF-Y-dependent activation. Functional cooperation between p53 and NF-Y has been described to occur on several promoters of genes in-

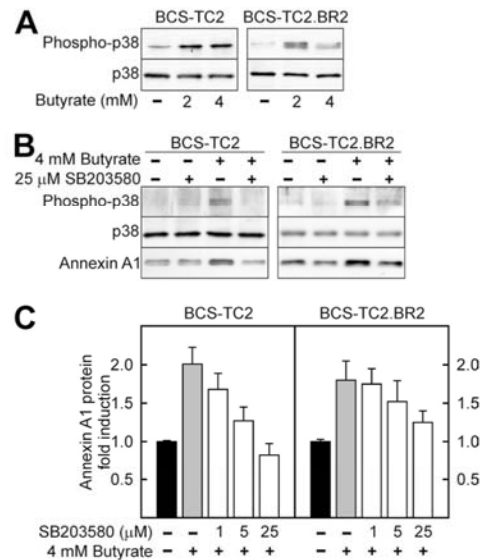


FIG. 6. Influence of p38 MAPK activity in annexin A1 protein induction. (A) p38 MAPK activation after butyrate treatment was assessed by analysis of its phosphorylation in extracts obtained from control and butyrate-treated BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells. Total levels of p38 MAPK are shown as a control. (B and C) Involvement of p38 MAPK in annexin A1 protein expression induction by butyrate was assessed after treatment of the cells with the specific inhibitor SB203580 either in the absence or in the presence of butyrate. (B) Representative Western blot using 25 μ M SB203580 in the presence or absence of butyrate treatment. (C) Quantification of the effects of different concentrations of SB203580 on annexin A1 expression referred to controls in the absence of butyrate and in the presence of the indicated concentration of p38 MAPK inhibitor. Data in panel C correspond to mean values (\pm SD) obtained from the densitometric analysis of blots from three independent experiments.

involved in the cell cycle as well as in endoplasmic reticulum stress. In contrast to *annexin A1*, these promoters present several CCAAT boxes and no p53 binding site. In these genes, the induction of p53 by DNA damage leads to promoter activity repression through cooperation with bound NF-Y (18, 24). Taking into account that p53 seems to activate basal transcription of the *annexin A1* gene, it is difficult to envision how butyrate treatment could dramatically change its behavior. This effect could be, on the contrary, derived from the removal of the p53 binding in the transfected constructs, which may render the CCAAT box more accessible to CCAAT-binding factors activated after treatment with HDAC inhibitors. This could explain the strong decrease in butyrate-induced activation after the removal of the CCAAT box. An alternative explanation is that the removal of the proximal CCAAT box, close to the TATA box, induces an artifact in the in vitro assays, impairing the binding of the transcriptional initiator complex to the truncated promoter construct.

The data from ChIP assays indicate that, even though NF-Y may be important for *annexin A1* basal expression (either binding directly to the CCAAT box or indirectly forming a complex with p53), butyrate upregulation of this gene involves the release of NF-Y from the CCAAT box and this release is inde-

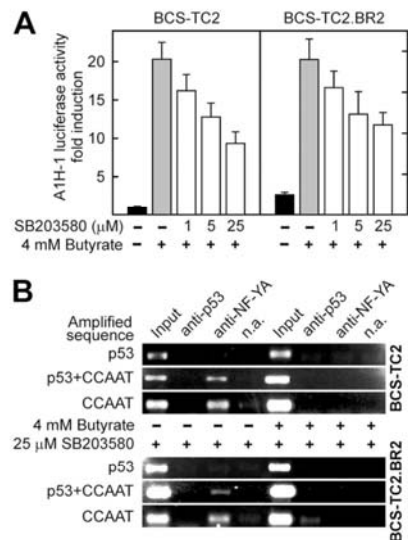


FIG. 7. Effect of p38 MAPK inhibition on butyrate activation of the *annexin A1* promoter and in the binding of p53 and NF-Y transcription factors. (A) Luciferase activity was measured in BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cell homogenates obtained after transfection with the A1H-1 construct and treatment for 24 h with 4 mM butyrate in the presence or absence of 1, 5, or 25 μM SB203580. Activity is expressed as induction with respect to the activity of butyrate-untreated, transfected cells. Data correspond to mean values (\pm SD) from two independent experiments with triplicate samples. (B) Binding of p53 and NF-Y transcription factors to the *annexin A1* gene in cells untreated (–) or treated for 24 h with 4 mM butyrate (+) was analyzed by ChIP in the presence of 25 μM SB203580, using antibodies against p53 and NF-YA. The immunoprecipitated samples were analyzed by PCR using the primers given in Fig. 4A. As controls for the ChIP experiment, PCR was also carried out with the input fraction and with samples obtained in the absence of specific antibodies (n.a.).

pendent of the butyrate-induced p38 MAPK activation. It has been previously shown that p21 represses NF-Y binding to DNA through inhibition of NF-YA phosphorylation by *cdk2* (49). Interestingly, we have previously described that the expression of the cell cycle inhibitor p21 after butyrate treatment increases in BCS-TC2 and BCS-TC2.BR2 cells (23). This could explain why NF-Y does not bind the *annexin A1* promoter directly after butyrate treatment.

We have demonstrated the presence of a functional p53 binding site near the proximal CCAAT box, and ChIP analysis strongly suggests that a complex between p53 and NF-Y is binding through the p53 site and not to the CCAAT box. In the absence of butyrate, this complex is more abundant in BCS-TC2 cells than in the butyrate-resistant ones, suggesting that in parental cells NF-Y binds mainly to the promoter through the p53 site. Upon butyrate treatment, a switch is observed in BCS-TC2 cells and no NF-Y is detected in the promoter, either directly bound or bound through p53.

However, in butyrate-treated BCS-TC2.BR2 cells NF-Y is still present at the p53 binding location associated with this transcription factor. This different behavior must be related to butyrate resistance in BCS-TC2.BR2 cells. Even if the interaction between p53 and NF-Y is detected in both cell lines

after butyrate treatment, one could speculate that a higher p53 acetylation status in butyrate-sensitive cells may foster its binding to the promoter on its own in preference to the complex with NF-Y. On this idea, it has been recently described that p53 acetylation could disrupt p53/NF-Y interaction on promoters of proapoptotic genes, leading to their activation (2). This model could also explain the increased activation of the promoter observed in BCS-TC2 in luciferase assays compared to that in butyrate-resistant cells, even when a significant decrease in p53 levels is observed.

Despite the differences in basal activity and quantitative effects of butyrate and TSA on the *annexin A1* promoter, the effects of both HDAC inhibitors are qualitatively similar in BCS-TC2 cells and BCS-TC2.BR2 butyrate-resistant cells. This result agrees with our previous data indicating that BCS-TC2.BR2 cells are resistant to apoptosis but not to the differentiation induced by this agent (23), reinforcing the role of annexin A1 as a differentiation marker in these cells.

We also wanted to gain insight into the signaling pathways involved in annexin A1 modulation. It has been previously described that butyrate induces phosphorylation of p38 MAPK (48); moreover, this MAPK, but not extracellular signal-regulated kinase, has been shown to play an important role in regulation of Caco-2 cell differentiation by butyrate (6). Considering these data, we checked the possible implication of p38 MAPK on the regulation of *annexin A1* transcription by butyrate. We demonstrate that *annexin A1* upregulation depends on p38 MAPK activation induced by butyrate. Direct NF-Y binding to the promoter through the proximal CCAAT box is independent of p38 MAPK, but p53 binding is almost completely blocked by its inhibition. Phosphorylation at Ser 33 or 46 (targets of p38 MAPK in the N-terminal domain of p53) (<http://www.biology.bnl.gov/cellbio/anderson.html>) could then be required for its binding to the promoter. However, inhibition of p38 MAPK is not able to reduce A1H-1 promoter activation by butyrate to values for nontreated cells, even at 25 μM SB203580. Additional modifications and/or factors must thus contribute to butyrate effects. Increased phosphorylation of p53, together with a potential increase in the acetylation status due to inhibition of HDACs, may be at least partially responsible for the butyrate-induced transcriptional activation.

Regarding p38 MAPK activation upstream events, it has been described that butyrate is able to activate protein kinase C δ and, interestingly, that this isoform specifically activates p38 MAPK (26). Additionally, phorbol ester-induced differentiation involves an increase in annexin A1 expression in several cell types, such as macrophages and keratinocytes (41). These agents act through activation of protein kinase C, further supporting the role of these proteins in the regulation of annexin A1 expression in response to differentiating stimuli.

In summary, here we show that *annexin A1* promoter activity is controlled by a functional cooperation between p53 and factors binding to the proximal CCAAT box. Differences in p53 status may underlie the changes in annexin A1 expression reported to occur in several models and cancer types. The induction of the expression of this protein by butyrate involves both p38 MAPK-dependent p53 activation and p38 MAPK-independent release of NF-Y on its promoter. Taking into account the role of p38 MAPK in the differentiation program induced by butyrate in colon epithelial cells, our results rein-

force the role of annexin A1 as a marker of this process. The mechanism of regulation of annexin A1 provides the basis for the action of butyrate on a wide range of genes and will help to elucidate the role of this protein in colonic epithelial cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant BFU2005-02671 from the DGI, Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

We thank S. E. Moss (Institute of Ophthalmology, University College of London, United Kingdom) and M. P. Fernandez (Dept. of Biochemistry, University of Oviedo, Spain) for providing *annexin A1* promoter constructs and G. López-Rodas and L. Franco (Dept. of Biochemistry, University of Valencia) for their assistance and discussion of the ChIP assays. We are also grateful to Ricardo Ramos (Unidad de Genómica, Parque Científico de Madrid) for his assistance with quantitative real-time PCR. The anti-human annexin A1 EH17a monoclonal antibody developed by J. D. Ernst was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, developed under the auspices of the NICHD, and maintained by The University of Iowa, Dept. of Biological Sciences, Iowa City, IA.

REFERENCES

- Bai, X. F., X. G. Ni, P. Zhao, S. M. Liu, H. X. Wang, B. Guo, L. P. Zhou, F. Liu, J. S. Zhang, K. Wang, Y. Q. Xie, Y. F. Shao, and X. H. Zhao. 2004. Overexpression of annexin I in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J. Gastroenterol.* **10**:1466–1470.
- Benatti, P., V. Basile, D. Merico, L. I. Fantoni, E. Tagliafico, and C. Imbriano. 2008. A balance between NF- κ B and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response. *Nucleic Acids Res.* **36**:1415–1428.
- Bevilacqua, M. A., M. C. Faniello, B. Iovine, T. Russo, F. Cimino, and F. Costanzo. 2002. Transcription factor NF- κ B regulates differentiation of CaCo-2 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **407**:39–44.
- Cartharius, K., K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein, and T. Werner. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**:2933–2942.
- D'Acquisto, F., A. Merghani, E. Lecona, G. Rosignoli, K. Raza, C. D. Buckley, R. J. Flower, and M. Perretti. 2007. Annexin I modulates T-cell activation and differentiation. *Blood* **109**:1095–1102.
- Daniel, C., O. Schroder, N. Zahn, T. Gaschott, and J. Stein. 2004. p38 MAPK signaling pathway is involved in butyrate-induced vitamin D receptor expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**:1220–1226.
- Davie, J. R. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* **133**:2485S–2493S.
- Djelloul, S., M. E. Forgue-Lafitte, B. Hermelin, M. Mareel, E. Bruyneel, A. Baldi, A. Giordano, E. Chastre, and C. Gespach. 1997. Enterocyte differentiation is compatible with SV40 large T expression and loss of p53 function in human colonic Caco-2 cells. Status of the pRb1 and pRb2 tumor suppressor gene products. *FEBS Lett.* **406**:234–242.
- Donnelly, S. R., and S. E. Moss. 1998. Functional analysis of the human annexin I and VI gene promoters. *Biochem. J.* **332**:681–687.
- Gerke, V., C. E. Creutz, and S. E. Moss. 2005. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:449–461.
- Gerke, V., and S. E. Moss. 2002. Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* **82**:331–371.
- Gui, C. Y., L. Ngo, W. S. Xu, V. M. Richon, and P. A. Marks. 2004. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:1241–1246.
- Guzmán-Arangué, A., N. Olmo, J. Turnay, E. Lecona, P. Perez-Ramos, I. López de Silanes, and M. A. Lizarbe. 2005. Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J. Cell Biochem.* **94**:178–193.
- Hannon, R., J. D. Croxtall, S. J. Getting, F. Rovizzo, S. Yona, M. J. Paul-Clark, F. N. Gavins, M. Perretti, J. F. Morris, J. C. Buckingham, and R. J. Flower. 2003. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin I^{-/-} mouse. *FASEB J.* **17**:253–255.
- Hirose, T., Y. Sowa, S. Takahashi, S. Saito, C. Yasuda, N. Shindo, K. Furuchi, and T. Sakai. 2003. p53-independent induction of Gadd45 by histone deacetylase inhibitor: coordinate regulation by transcription factors Oct-1 and NF- κ B. *Oncogene* **22**:7762–7773.
- Hoh, J., S. Jin, T. Parrado, J. Edington, A. J. Levine, and J. Ott. 2002. The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:8467–8472.
- Huang, W., S. Zhao, S. Ammanamanchi, M. Brattain, K. Venkatasubbarao, and J. W. Freeman. 2005. Trichostatin A induces transforming growth factor beta type II receptor promoter activity and acetylation of Sp1 by recruitment of PCAF/p300 to a Sp1/NF- κ B complex. *J. Biol. Chem.* **280**:10047–10054.
- Imbriano, C., A. Gurtner, F. Cocchiarella, S. Di Agostino, V. Basile, M. Gostissa, M. Döbelstein, G. Del Sal, G. Piaggio, and R. Mantovani. 2005. Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G₂M promoters. *Mol. Cell. Biol.* **25**:3737–3751.
- Isacke, C. M., R. A. Lindberg, and T. Hunter. 1989. Synthesis of p36 and p35 is increased when U-937 cells differentiate in culture but expression is not inducible by glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* **9**:232–240.
- Jin, S., and K. W. Scotto. 1998. Transcriptional regulation of the *MDR1* gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* **18**:4377–4384.
- Kim, S. W., H. J. Rhee, J. Ko, Y. J. Kim, H. G. Kim, J. M. Yang, E. C. Choi, and D. S. Na. 2001. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J. Biol. Chem.* **276**:15712–15719.
- Lopez-Conejo, T., N. Olmo, J. Turnay, J. Navarro, and A. Lizarbe. 1996. Characterization of tumorigenic sub-lines from a poorly tumorigenic human colon-adenocarcinoma cell line. *Int. J. Cancer* **67**:668–675.
- López de Silanes, I., N. Olmo, J. Turnay, G. González de Buitrago, P. Pérez-Ramos, A. Guzmán-Arangué, M. García-Díez, E. Lecona, M. Gorospe, and M. A. Lizarbe. 2004. Acquisition of resistance to butyrate enhances survival after stress and induces malignancy of human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **64**:4593–4600.
- Manni, L., G. Mazzaro, A. Gurtner, R. Mantovani, U. Haugwitz, K. Krause, K. England, A. Sacchi, S. Soddu, and G. Piaggio. 2001. NF- κ B mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2, and cdc25C promoters upon induced G2 arrest. *J. Biol. Chem.* **276**:5570–5576.
- Marutani, M., H. Tonoki, M. Tada, M. Takahashi, H. Kashiwazaki, Y. Hida, J. Hamada, M. Asaka, and T. Moriuchi. 1999. Dominant-negative mutations of the tumor suppressor p53 relating to early onset of glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* **59**:4765–4769.
- McMillan, L., S. K. Butcher, J. Pongracz, and J. M. Lord. 2003. Opposing effects of butyrate and bile acids on apoptosis of human colon adenoma cells: differential activation of PKC and MAP kinases. *Br. J. Cancer* **88**:748–753.
- Minucci, S., and P. G. Pelicci. 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**:38–51.
- Nakano, K., T. Mizuno, Y. Sowa, T. Orita, T. Yoshino, Y. Okuyama, T. Fujita, N. Ohtani-Fujita, Y. Matsukawa, T. Tokino, H. Yamagishi, T. Oka, H. Nomura, and T. Sakai. 1997. Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *J. Biol. Chem.* **272**:22199–22206.
- Navarro, J. M., N. Olmo, J. Turnay, M. T. López-Conejo, and M. A. Lizarbe. 1997. Differentiation of BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells by sodium butyrate: increase in 5'-nucleotidase activity. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**:620–628.
- Olmo, N., J. Turnay, E. Lecona, M. García-Díez, B. Llorente, A. Santiago-Gómez, and M. A. Lizarbe. 2007. Acquisition of resistance to butyrate induces resistance to luminal components and other types of stress in human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol. In Vitro* **21**:254–261.
- Omer, S., D. Meredith, J. F. Morris, and H. C. Christian. 2006. Evidence for the role of adenosine 5'-triphosphate-binding cassette (ABC)-A1 in the externalization of annexin I from pituitary folliculostellate cells and ABCA1-transfected cell models. *Endocrinology* **147**:3219–3227.
- Parente, L., and E. Solito. 2004. Annexin I: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm. Res.* **53**:125–132.
- Patton, K. T., H. M. Chen, L. Joseph, and X. J. Yang. 2005. Decreased annexin I expression in prostatic adenocarcinoma and in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Histopathology* **47**:597–601.
- Perretti, M., and F. N. Gavins. 2003. Annexin I: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol. Sci.* **18**:60–64.
- Petrella, A., C. W. D'Acunto, M. Rodriguez, M. Festa, A. Tosco, I. Bruno, S. Terracciano, M. Taddei, L. G. Paloma, and L. Parente. 2008. Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: Role of Annexin A1. *Eur. J. Cancer* **44**:740–749.
- Petrella, A., M. Festa, S. F. Ercolino, M. Zerilli, G. Stassi, E. Solito, and L. Parente. 2006. Annexin-1 downregulation in thyroid cancer correlates to the degree of tumor differentiation. *Cancer Biol. Ther.* **5**:643–647.
- Rodrigo, J. P., J. M. García-Pedrero, M. V. González, M. P. Fernandez, C. Suarez, and A. Herrero. 2004. Expression of annexin A1 in normal and chronically inflamed nasal mucosa. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **130**:211–215.
- Sandoval, J., J. L. Rodríguez, G. Tur, G. Serviddio, J. Pereda, A. Boukaba, J. Sastre, L. Torres, L. Franco, and G. López-Rodas. 2004. RNAi-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription. *Nucleic Acids Res.* **32**:e88.
- Scheppach, W., and F. Weiler. 2004. The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7**:563–567.
- Shen, D., F. Noorai, Y. Elshimali, V. Lonsberry, J. He, S. Bose, D. Chia, D. Seligson, H. R. Chang, and L. Goodlick. 2006. Decreased expression of annexin A1 is correlated with breast cancer development and progression as determined by a tissue microarray analysis. *Hum. Pathol.* **37**:1583–1591.
- Solito, E., C. de Coupade, L. Parente, R. J. Flower, and F. Russo-Marie.

1998. Human annexin 1 is highly expressed during the differentiation of the epithelial cell line A 549: involvement of nuclear factor interleukin 6 in phorbol ester induction of annexin 1. *Cell Growth Differ.* **9**:327–336.
42. Solito, E., C. de Coupade, L. Parente, R. J. Flower, and F. Russo-Marie. 1998. IL-6 stimulates annexin 1 expression and translocation and suggests a new biological role as class II acute phase protein. *Cytokine* **10**:514–521.
 43. Tabe, Y., L. Jin, R. Contractor, D. Gold, P. Ruvoilo, S. Radke, Y. Xu, Y. Tsutsumi-Ishii, K. Miyake, N. Miyake, S. Kondo, A. Ohsaka, I. Nagaoka, M. Andreeff, and M. Konopleva. 2007. Novel role of HDAC inhibitors in AML1/ETO AML cells: activation of apoptosis and phagocytosis through induction of annexin A1. *Cell Death Differ.* **14**:1443–1456.
 44. Turnay, J., N. Olmo, J. G. Gavilanes, J. Benítez, and M. A. Lizarbe. 1990. Establishment and characterization of a new human colon adenocarcinoma cell line: BCS-TC2. *Cytotechnology* **3**:75–88.
 45. Vishwanatha, J. K., E. Salazar, and V. K. Gopalakrishnan. 2004. Absence of annexin I expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and cell lines. *BMC Cancer* **4**:8.
 46. Wang, K. L., T. T. Wu, E. Resetkova, H. Wang, A. M. Correa, W. L. Hofstetter, S. G. Swisher, J. A. Ajani, A. Rashid, S. R. Hamilton, and C. T. Albarracín. 2006. Expression of annexin A1 in esophageal and esophago-gastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Clin. Cancer Res.* **12**:4598–4604.
 47. Wu, C. M., Y. S. Lee, T. H. Wang, L. Y. Lee, W. H. Kong, E. S. Chen, M. L. Wei, Y. Liang, and T. L. Hwang. 2006. Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray. *Oncol. Rep.* **15**:57–64.
 48. Yonezawa, T., Y. Kobayashi, and Y. Obara. 2007. Short-chain fatty acids induce acute phosphorylation of the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway via GPR43 in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cell. Signal.* **19**:185–193.
 49. Yun, J., H. D. Chae, T. S. Choi, E. H. Kim, Y. J. Bang, J. Chung, K. S. Choi, R. Mantovani, and D. Y. Shin. 2003. Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **278**:36966–36972.
 50. Zhao, Y., S. Lu, L. Wu, G. Chai, H. Wang, Y. Chen, J. Sun, Y. Yu, W. Zhou, Q. Zheng, M. Wu, G. A. Otterson, and W. G. Zhu. 2006. Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21^{Waf1/Cip1}. *Mol. Cell. Biol.* **26**:2782–2790.

4.2.3. Papel de la región N-terminal de la anexina A5 en la agregación de vesículas.

Una de las funciones descritas para la familia de las anexinas es la regulación del tráfico intracelular de vesículas para lo cual se requiere que induzcan la agregación de estas a otras membranas biológicas. Aunque la anexina A5 humana carece de esta habilidad, su homóloga en pollo sí es capaz de inducir dicha agregación. En este trabajo se ha demostrado que dicha funcionalidad reside en el dominio N-terminal de la anexina A5 de pollo, y que la sustitución del dominio N-terminal humano por el de pollo confiere a la anexina humana dicha capacidad de agregación.

Artículo 7: Javier Turnay, Ana Guzmán-Aranguez, Emilio Lecona, **Juan I. Barrasa**, Nieves Olmo y M^a Antonia Lizarbe. “Key role of the N-terminus of chicken annexin A5 in vesicle aggregation.”

Protein Science **18**:1095-1106 (2009).

Trabajos previos del grupo permitieron poner a punto tanto la expresión como la purificación de diferentes miembros de la familia de las anexinas, entre ellos la anexina A5 tanto humana como de pollo. En este estudio se han clonado, expresado y purificado diferentes variantes de esta proteína: las formas naturales humana y de pollo, la anexina de pollo truncada en su dominio N-terminal y una proteína quimérica donde se ha sustituido el dominio N-terminal en la anexina A5 humana por el de su homóloga de pollo. El análisis de las correspondientes estructuras por dicroísmo circular muestra que estas no se alteran de modo significativo tras las modificaciones introducidas en la secuencia. En cuanto a la interacción con vesículas fosfolipídicas en presencia de diferentes concentraciones de calcio, en todas las anexinas se mantiene el comportamiento cooperativo, si bien la forma truncada de pollo y la quimera requieren concentraciones de calcio ligeramente superiores. El calcio induce un cambio conformacional que expone el Trp¹⁸⁷ tanto en las formas nativas como en la quimera o la anexina de pollo truncada. La afinidad de las anexinas por las vesículas se altera, al obtenerse una constante de disociación mayor en la quimera y la forma truncada respecto a las dos anexinas nativas. Por otra parte, se ha confirmado que la anexina A5 de pollo tiene la habilidad de inducir agregación de vesículas, mientras que su

homóloga humana no manifiesta dicha capacidad. El dominio N-terminal parece ser esencial para la inducción de agregación, pero otras regiones de la proteína deben colaborar en este proceso, ya que ni la forma truncada pierde completamente esta funcionalidad, ni la quimera le otorga a la anexina humana la misma capacidad observada en pollo. Estos resultados, junto a los obtenidos en los ensayos de entrecruzamiento sugieren que la agregación de vesículas ocurre por dimerización de moléculas de anexina A5 presentes en diferentes vesículas a través del núcleo proteico de la anexina.

Aportación personal

En este trabajo se ha participado en la expresión y purificación de las diferentes formas de la anexina A5, habiéndolo también colaborado en los análisis espectroscópicos.

Key role of the N-terminus of chicken annexin A5 in vesicle aggregation

Javier Turnay, Ana Guzmán-Aránguez, Emilio Lecona, Juan I. Barrasa, Nieves Olmo, and M^a Antonia Lizarbe*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain

Received 3 November 2008; Accepted 27 February 2009

DOI: 10.1002/pro.119

Published online 16 March 2009 proteinscience.org

Abstract: Annexins are calcium-dependent phospholipid-binding proteins involved in calcium signaling and intracellular membrane trafficking among other functions. Vesicle aggregation is a crucial event to make possible the membrane remodeling but this process is energetically unfavorable, and phospholipid membranes do not aggregate and fuse spontaneously. This issue can be circumvented by the presence of different agents such as divalent cations and/or proteins, among them some annexins. Although human annexin A5 lacks the ability to aggregate vesicles, here we demonstrate that its highly similar chicken ortholog induces aggregation of vesicles containing acidic phospholipids even at low protein and/or calcium concentration by establishment of protein dimers. Our experiments show that the ability to aggregate vesicles mainly resides in the N-terminus as truncation of the N-terminus of chicken annexin A5 significantly decreases this process and replacement of the N-terminus of human annexin A5 by that of chicken switches on aggregation; in both cases, there are no changes in the overall protein structure and only minor changes in phospholipid binding. Electrostatic repulsions between negatively charged residues in the concave face of the molecule, mainly in the N-terminus, seem to be responsible for the impairment of dimer formation in human annexin A5. Taking into account that chicken annexin A5 presents a high sequence and structural similarity with mammalian annexins absent in birds, as annexins A3 and A4, some of the physiological functions exerted by these proteins may be carried out by chicken annexin A5, even those that could require calcium-dependent membrane aggregation.

Keywords: calcium binding; circular dichroism spectroscopy; crosslinking; fluorescence emission spectroscopy; liposomes; phospholipid binding

Abbreviations: bA4, bovine annexin A4; cA5, chicken annexin A5; cNt-hA5, chimera of human annexin A5 protein core with the N-terminus from chicken annexin A5; dnt-cA5, chicken annexin A5 with deleted N-terminus; hA5, human annexin A5; HTS, heparin tetrasaccharide [$\Delta^{4,5}$ -2-O-sulfo-uronic acid(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl-6-O-sulfate(1 \rightarrow 4)-2-O-sulfo- α -L-iduronic acid(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl-6-O-sulfate]; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PS, phosphatidylserine.

Grant sponsor: The Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain); Grant numbers: BFU2005-02671 and BFU2008-04758.

*Correspondence to: M^a Antonia Lizarbe, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040—Madrid, Spain.

E-mail: lizarbe@bbm1.ucm.es

Introduction

Annexins constitute a superfamily of calcium-dependent membrane-binding proteins that are mainly intracellular and are involved in a wide variety of intra- and extracellular functions.^{1–3} The ability to interact with acidic phospholipids lies in a highly conserved protein core composed of four homologous domains (eight in annexin A6); each conserved domain within the protein core is folded into five α helices and these, in turn, are wound into a right-handed super-helix. The four domains are packed into a disc-shaped structure with a slightly convex face where the type-2 calcium and phospholipid binding loops are located. The concave face, which is opposite to the membrane-binding surface, is mainly formed by the “C” helices of

each domain together with the N-terminal extension that closes the structure by bringing together domains I and IV. The N-terminal domain shows the greatest variability within annexins both in length and amino acid composition, ranging from a few residues, as in annexin A5, to 200 or more residues (i.e., annexin A11). Although this extension is markedly smaller than the protein core, it greatly influences the overall protein stability and determines the structural arrangement of protein regions located in the opposite side of the molecule.⁴ In addition, specific functions of each annexin and their regulation are mainly dependent on this variable extension.^{4,5}

Annexins are involved in several physiological functions, among them membrane trafficking, endo and exocytosis, and in the interaction between membranes and the cytoskeleton; for several of these functions, annexins not only require their binding to membranes but they must also show an ability to act as protein bridges between membranes. Several vertebrate annexins, including annexins A1, A2, A4, and A7, are able to aggregate phospholipid-containing vesicles when bound to membranes,^{6–10} whereas others as annexins A3, A5, A6, A11, and nonmyristoylated A13b do not promote aggregation.^{6,11,12} This process is negatively regulated by phosphorylation of the N-terminal domain at serine/threonine and tyrosine residues^{5,13} or by proteolysis of the N-terminal extension.¹⁴

A prerequisite for aggregation is that annexins must bind first to the vesicles. In a second step, it has been described that aggregation is induced by two different potential mechanisms. The first model assumes that vesicle aggregation results from the interaction of annexin molecules bound to different vesicles via protein–protein interaction (dimer formation or establishment of heterotetramers with proteins from the S100 family).^{7,14–16} The second model proposes that annexins may reveal a secondary phospholipid binding site in their N-terminus after binding to a vesicle through the primary binding site, thus establishing a single annexin protein bridge.^{9,10,14,17}

Human annexin A5 (hA5) has been used as a model of nonmembrane aggregating annexin and used to construct chimeras to verify that the vesicle aggregation ability of annexin A1 (one of the most extensively studied aggregation-inducing annexins) lies in its N-terminal domain.^{14,18,19} However, during the purification and characterization of chicken annexin A5 (cA5) and its truncated mutant lacking eight amino acids from the N-terminus (dnt-cA5), we found some experimental evidences that suggested that this annexin, in contrast to its mammal orthologs, did induce vesicle aggregation.^{20–22} In view of the relevance that vesicle aggregation has for membrane trafficking, we decided to confirm the anomalous behavior of cA5 and to further investigate the structural determinant of the vesicle aggregation activity of cA5. As the N-terminus of annexins is their major regulatory

domain, we have centred this study mainly in this region; thus, we have studied the effect of a partial truncation of the N-terminus and constructed a chimera comprising the N-terminus of cA5 and the protein core of hA5 (cNt-hA5). In addition, we discuss whether cA5 may assume functions exerted in mammals by annexins with a high degree of sequence similarity with cA5 but whose genes are absent in birds (e.g., annexins A4 and to a lower extent A3).

Results

Cloning, purification and structural characterization of the recombinant proteins

We have previously obtained and characterized cA5 and a mutant with a deletion of eight amino acids from the N-terminus (dnt-cA5), as well as hA5.^{20–22} Here, we have cloned a chimera comprising the N-terminus of cA5 and the protein core of hA5 [(Fig. 1(A,B)). This chimera, as well as recombinant cA5, hA5, and dnt-cA5, were purified from JA221 *E. Coli* cultures transformed with the corresponding constructs after induction with 1 mM IPTG. The final protein preparations obtained after DEAE-cellulose chromatography were free of any detectable contaminations after analysis by SDS-PAGE followed by silver nitrate staining. Figure 1(C) shows the electrophoretic analysis of the material from different steps in the purification of cNt-hA5 after Coomassie blue staining or Western blot using anti-hA5 antibodies. The reversible interaction of cNt-hA5 with phosphatidylserine (PS) vesicles indicates that the chimera is functional regarding its ability to bind to acidic phospholipids. Moreover, CD spectroscopy reveals the correct folding of the proteins and that the secondary structure of cNt-hA5 is almost identical to hA5 (see Fig. 2). On the other hand, cA5 and its truncated form show slightly higher negative ellipticity values mainly at the 222 nm minimum. In any case, analysis of the spectra using the algorithm described by Perczel et al.²³ does not reveal significant variations in the overall α -helical content and only minor variations in the β -sheet and random coil percentages (cA5 and dnt-cA5: 80–81% α -helix, 0–1% β -sheet, 5% β -turns, and 14% random coil; hA5 and cNt-hA5: 77–78% α -helix, 0% β -sheet, 11% β -turns, and 11–12% random coil). More significant changes are observed when thermal unfolding is considered (Fig. 2, Inset). The most stable protein is cA5 with a melting temperature (T_m) of $59.2 \pm 0.4^\circ\text{C}$; truncation of the N-terminus is accompanied by a highly significant decrease in T_m (around 7°C). hA5 and the chimeric protein cNt-hA5 show a quite similar thermal unfolding (T_m , 50.2°C) that surprisingly is even lower than that of truncated dnt-cA5. The final heat-unfolded state seems to differ from chicken to human annexins, although in all of the cases the process is irreversible; hA5 and cNt-hA5 show an apparent intermediate state at around 60°C with high

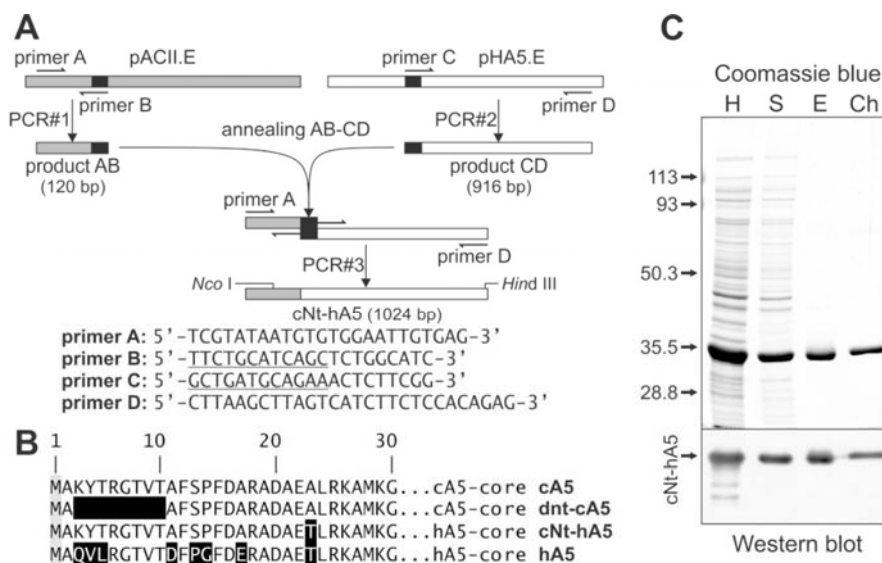


Figure 1. Construction and expression of the cNt-hA5 chimera. **(A)** Scheme of the splicing by overlap extension technique used for the construction of cNt-hA5; primers sequences are indicated. **(B)** Sequences of the N-terminal domains are given in the one letter code; reverse shading indicates residues that differ between cA5 and hA5. **(C)** Purification steps during cNt-hA5 purification followed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining (upper panel) and Western blot using polyclonal antibodies against hA5. Exponentially growing pcNt-cA5.E transformed JA221 *E. coli* cultures were induced for 16 h with 1 mM IPTG, centrifuged and homogenized by sonication in the presence 2.5 mM EGTA (H); after centrifugation for 1 h at 35,000g and 4°C, the supernatant (S) was decanted and PS-enriched liposomes (1 mg/mL) and CaCl₂ (2 mM final concentration) were added. Interaction with liposomes was allowed for 30 min at 4°C and the vesicles were sedimented by centrifugation, washed with buffer containing 1 mM CaCl₂ and finally, the recombinant protein was extracted from the vesicles by resuspension in buffer containing 5 mM EGTA and centrifugation (E). A final ion-exchange chromatographic purification step in DEAE-cellulose yielded the cNt-hA5 preparation (Ch).

β-sheet content (>50%), whereas cA5 and dnt-cA5 do not. This is probably due to a faster macroscopical aggregation of denatured chicken annexins, whereas this process is slower in the human counterparts.

Interaction with acidic phospholipid vesicles

Binding of the recombinant annexins to PS liposomes was studied by ultracentrifugation using 400 nm vesicles (600:1 lipid:protein molar ratio) and increasing CaCl₂ concentration (see Fig. 3). Calcium dependence for binding was quite similar between chicken and human intact proteins (around 45–50 μM CaCl₂ for 50% binding) with slightly higher calcium requirements for truncated dnt-cA5 and for the chimera (around 70 μM). In all of the cases, the behavior was highly cooperative and annexins were completely bound at 100–150 μM CaCl₂ under these experimental conditions.

In addition, binding was analyzed by fluorescence emission spectroscopy using unilamellar 50 nm PS-vesicles. Figure 4 shows the spectra obtained for the four recombinant proteins in the absence of calcium and PS (dashed lines) and in the presence of 200 μM CaCl₂ and increasing PS to protein molar ratios. cA5 and dnt-cA5 spectra are unaffected by addition of 200 μM Ca²⁺, but hA5 spectrum shows a 7-nm shift in its maximum; cNt-hA5 shows an intermediate

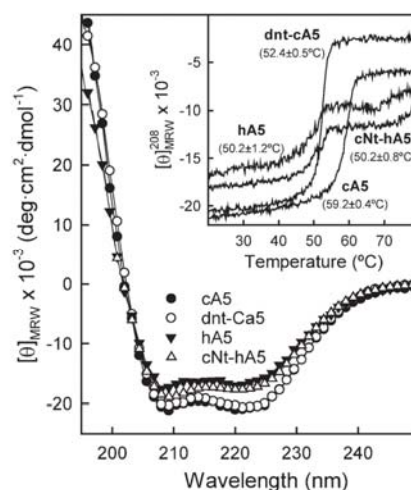


Figure 2. Far-UV circular dichroism spectra and thermal stability of purified recombinant proteins. Spectra were registered at 20°C in 20 mM Hepes, pH 7.4, containing 0.1M NaCl, and using protein preparations around 0.3 mg/mL. Inset: Thermal unfolding curves determined by monitoring of ellipticity changes at 208 nm between 20 and 80°C and increasing temperature at 60°C/h. Melting temperatures (T_m) are shown and correspond to mean values (\pm SD) of at least three independent determinations.

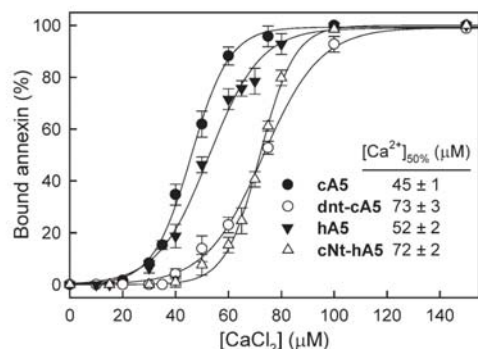


Figure 3. Liposome sedimentation assay comparing calcium dependence of the binding of recombinant proteins to PS unilamellar vesicles. Binding of recombinant proteins to 400 nm unilamellar PS vesicles was analyzed by ultracentrifugation in the presence of calcium concentrations ranging from 0 (1 mM EGTA) to 200 μM . Pellets were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining and densitometry. Data represent means ($\pm\text{SD}$) of at least three independent experiments.

behavior showing only a 2-nm shift in the spectrum. A more significant shift in the maximum towards higher wavelengths, together with an increase in the quantum yield (higher in cA5 and dnt-cA5 when compared with proteins with the human core), was observed in the

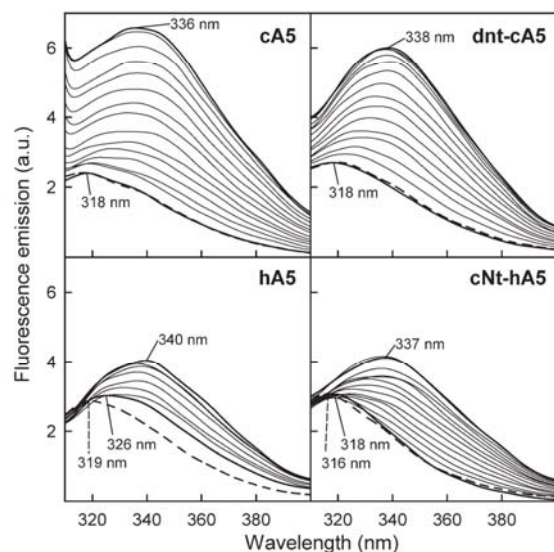


Figure 4. Fluorescence emission spectra of recombinant annexins bound to PS unilamellar vesicles. The influence of the lipid to protein molar ratio in the binding of the recombinant proteins to 50 nm PS unilamellar vesicles was analyzed by fluorescence emission spectroscopy. Spectra of the unique Trp residue present in the four recombinant proteins in the absence of calcium and PS (dashed lines) or in the presence of 200 μM CaCl_2 at increasing lipid to protein molar ratio (thicker lines represent $[L]/[P] = 0$ and 120) are shown. The wavelengths corresponding to the maxima of the most significant spectra are shown.

four recombinant proteins when PS-vesicles are added in the presence of 200 μM Ca^{2+} . This confirms that the conformational rearrangement that exposes Trp¹⁸⁷ after binding to phospholipid vesicles takes place not only in the intact proteins but also in dnt-cA5 and cNt-hA5.

Fluorescence emission spectra were analyzed and the ratio between fluorescence intensities at wavelengths corresponding to the emission maxima of completely bound or free annexin was plotted vs. the PS to protein molar ratio (see Fig. 5). This analysis reveals that half-maximal binding to 50-nm PS vesicles in the presence of 200 μM Ca^{2+} is achieved at PS to protein molar ratios ranging from 20 (cA5) to 45 (cNt-hA5). A more profound analysis of the binding data (Fig. 5 insets) reveals that the number of phospholipid molecules in the bilayers involved in binding of one molecule of annexin is quite similar for all the recombinant proteins (around 20) and that apparent dissociation constants are in the low micromolar range, being lowest for cA5 (1.2 μM) and highest for the chimera (5.3 μM).

Induction of vesicle aggregation

Once we had verified that all the recombinant proteins were able to bind to acidic phospholipid bilayers, we analyzed the ability to induce vesicle aggregation under different conditions (see Fig. 6). We have found that hA5 does not induce aggregation even at high

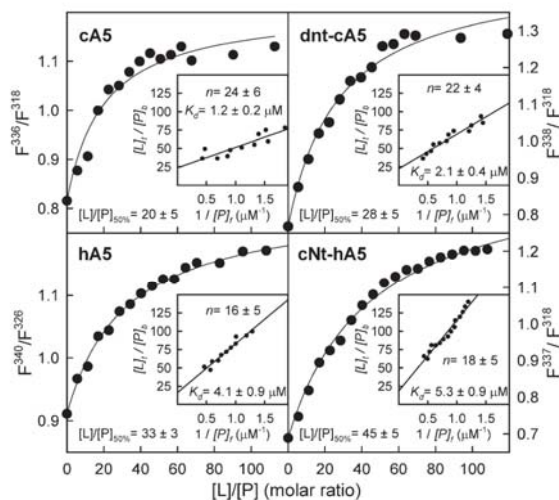


Figure 5. Analysis of the fluorescence emission spectra of recombinant annexins bound to PS unilamellar vesicles. Spectra from Figure 4 were analyzed and the main plots show the ratio between fluorescence intensities at wavelengths corresponding to the emission maxima of completely bound or free annexin in the presence of 200 μM CaCl_2 . The ratio required for 50% binding ($[L]/[P]_{50\%}$) under these experimental conditions is indicated. Insets: plots of $[L]/[P]_{50\%}$ vs. $1/[P]$ for each recombinant protein showing the values obtained for apparent K_d and n .

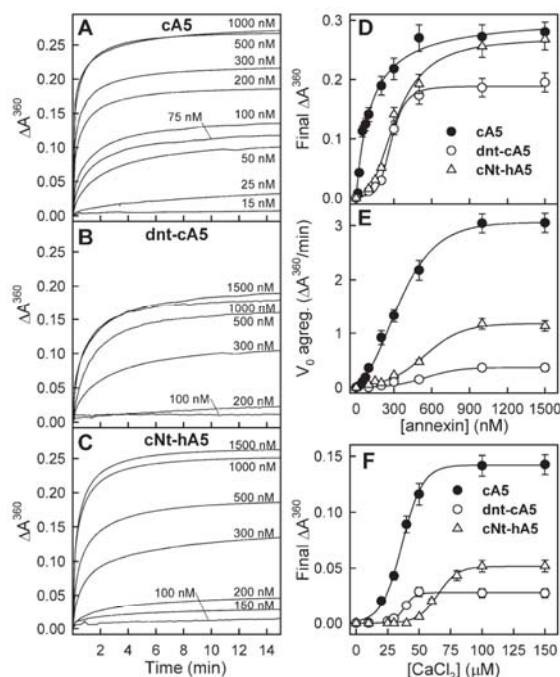


Figure 6. Annexin-induced vesicle aggregation. (A–C) Aggregation of 100 nm unilamellar PS vesicles was studied as a function of protein concentration in the presence of 200 μM $CaCl_2$. Aggregation was initiated by adding Ca^{2+} to a suspension of vesicles at the indicated protein concentration in 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.1M NaCl, and was followed by continuously monitoring absorbance at 360 nm in a thermostated cuvette at 20°C. hA5 did not induce aggregation even at high protein concentration (2 μM) and $CaCl_2$ up to 1 mM. (D, E) Aggregation curves in A–C were analyzed to determine the values of final ΔA_{360} and apparent initial aggregation velocity (V_0). The former parameter was determined from the non-linear regression to a hyperbola of the aggregation curve up to 15 min, whereas apparent V_0 was determined from the analysis of the data up to only 1 min. (F) Calcium dependence of annexin-induced vesicle aggregation was carried out as previously described but maintaining constant protein concentration (100 nM for cA5 and 200 nM for dnt-cA5 and cNt-hA5) and inducing aggregation by adding Ca^{2+} to achieve different final concentrations (up to 200 μM). Maximum ΔA_{360} was determined as described above. Data in D–F correspond to mean values (\pm SD) of three different experiments.

protein or calcium concentrations in accordance with previous reports⁶; on the other hand, cA5 induces this process even at very low protein concentration [above 15 nM; Fig. 6(A)]. Moreover, calcium requirements for aggregation are even lower than those required for maximal binding under identical lipid:protein molar ratio [$[Ca^{2+}]_{50\%} = 36 \pm 1 \mu M$; Fig. 6(F) when compared with Fig. 3], indicating that the aggregation process can be triggered by the binding of a small number of annexin molecules to the vesicles. The relevance of the N-terminal extension of chicken annexin A5 for

the induction of vesicle aggregation is put forward by the fact that truncation of this extension significantly decreases the vesicle aggregation ability of cA5. Figure 6(B) shows that, under identical experimental conditions, dnt-cA5 requires 10 times higher protein concentration than cA5 to be able to detect vesicle aggregation. The analysis of maximal ΔA_{360} and apparent initial velocity of aggregation [Fig. 6(D,E)] also clearly show that the removal of eight amino acids from the N-terminus impairs aggregation induced by the chicken annexin. More interestingly, the cNt-hA5 chimera, where the N-terminus of hA5 is replaced by that of cA5, gains the ability to induce vesicle aggregation [Fig. 6(C)] although to a lower extent than cA5 [lower final ΔA_{360} values at low protein concentration and lower apparent initial velocity; Fig. 6(D,E)]. Calcium requirements for aggregation are higher than those required by cA5 or dnt-cA5 in good agreement with the higher requirements also detected for binding to phospholipid vesicles.

The physiological relevance of the vesicle aggregation ability of cA5 was confirmed at the normal body temperature of the chicken (around 42°C). Figure 7(A) shows the PS aggregation curves at 42°C; time scale is expanded as the aggregation process showed higher apparent initial velocity rates at this temperature when compared with 20°C [Fig. 7(B)]. Calcium dependence for aggregation shows a more cooperative behavior at 42°C [Fig. 7(C)] than at 20°C [Fig. 6(F)] and a higher value of $[Ca^{2+}]_{50\%}$ ($94 \pm 2 \mu M$); in any case, maximal induction of aggregation is induced *in vitro* at similar concentrations (over 100 μM Ca^{2+}). Although it is not physiologically relevant, dnt-cA5 and cNt-hA5 also induced vesicle aggregation at 42°C and, as expected, hA5 did not either at 37 or at 42°C (data not shown).

The analysis of the initial aggregation rates is dependent on cA5 concentration at 20 and 42°C [Figs. 6(E) and 7(B)]. Double logarithmic plots of the values obtained at high lipid to protein molar ratios (over 1000-fold, where free lipid concentration can be considered constant), yield linear representations with slopes close to 2 [1.86 and 1.82 at 20 and 42°C, respectively; Fig. 7(B) inset]. Therefore, the aggregation process produced by cA5 is second order in protein concentration under these conditions indicating that the aggregation of PS vesicles by cA5 proceeds via formation of a protein dimer at the initial step.

Crosslinking of vesicle associated annexins

An experimental approach to detect protein to protein interactions was designed by inducing lysine crosslinking using BS³ under conditions of low and high occupancy of the outer layers of the vesicle membranes varying the lipid:protein molar ratio (600:1 and 100:1, respectively) (see Fig. 8). First, we verified that no intermolecular crosslinking was detected in the four recombinant proteins in solution (No PS) or in the presence of PS vesicles but in the absence of calcium

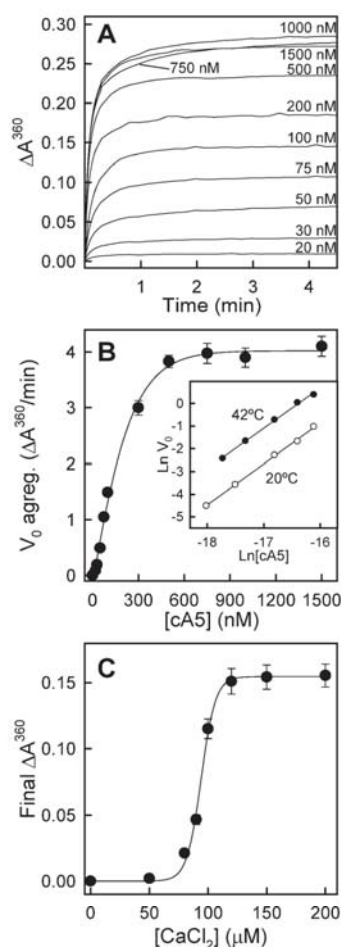


Figure 7. cA5-induced vesicle aggregation at chicken physiological temperature. Experiments were carried out as in Figure 6 but in a thermostated cuvette at 42°C. (A) Aggregation curves at different cA5 concentrations. (B) Analysis of the apparent initial aggregation rates; the Inset shows the double logarithmic plot of initial aggregation rates vs. cA5 concentration at lipid to protein molar ratios larger than 1000 (below 100 nM cA5). (C) Calcium dependence of cA5-induced vesicle aggregation was carried out maintaining constant protein concentration (100 nM) and inducing aggregation by adding Ca^{2+} to achieve different final concentrations (up to 200 μM). Data in B and C correspond to mean values ($\pm\text{SD}$) of three different experiments.

(1 mM EGTA). In some cases, mainly in hA5 and cNt-hA5, intramolecular crosslinking occurred and a double monomer band could be observed as a consequence of an improper unfolding by SDS.^{24,25} When crosslinking was carried out at a 100:1 lipid:protein molar ratio, lateral interactions among annexin molecules bound to the same vesicle are detected. Dimers, trimers, and higher molecular weight oligomers can be observed in the four proteins bound to PS vesicles, as it is shown for cA5 and hA5 in Figure 8. This observation is in good agreement with the well described abil-

ity of annexin A5 from different origins to oligomerize and form 2D crystals of trimers on the bilayer surface^{26–30} through an interfacial basic cluster in which at least one lysine residue is involved (Lys²⁹) and several other are at crosslinking distance.²⁸

When the crosslinking experiments are carried out at low membrane occupancy (600:1 lipid:protein molar ratio; 0.5 μM protein; 200 μM CaCl_2), under conditions equivalent to the aggregation assays, hA5 does not induce vesicle aggregation and interestingly, no oligomerization is observed (see Fig. 8). On the contrary, cA5 shows a strong band corresponding to a protein dimer and almost no higher molecular weight oligomers are observed (see Fig. 8). Dimer formation is also observed in the other two recombinant proteins that induce vesicle aggregation, the N-terminally truncated mutant dnt-cA5 and in the chimera cNt-hA5.

Inhibition of vesicle aggregation by heparin tetrasaccharide

Heparin tetrasaccharide [HTS; $\Delta\text{UA}, 2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNS}, 6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoUA}, 2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNS}, 6\text{S}$] has been reported to bind with high affinity to rat annexin A5³¹ at two basic amino acid clusters located in the concave face of the molecule, and with lower affinity to an additional site in the convex side. These sites are highly conserved in cA5; thus, we assayed the influence of binding of HTS to cA5 in vesicle aggregation, as HTS would bind to the exposed concave faces of the vesicle bound annexin molecules. As binding of HTS requires high calcium concentrations (around

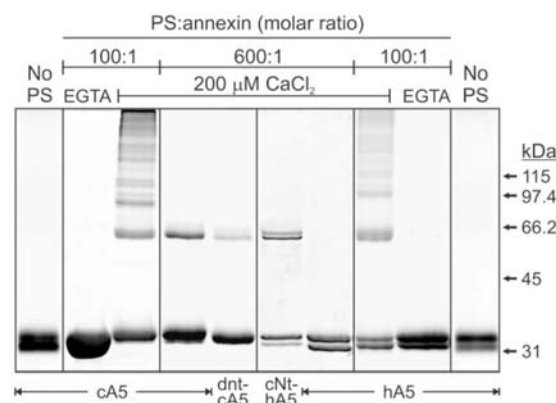


Figure 8. Crosslinking of annexins bound to PS unilamellar vesicles. Crosslinking of recombinant annexins was carried out at 100:1 and 600:1 phospholipid to annexin molar ratio in the presence of 200 μM Ca^{2+} using BS³; after stopping the crosslinking reaction, samples were centrifuged and the vesicle-bound annexin was analyzed. Controls were carried out in the presence of PS but without calcium (1 mM EGTA) or in the presence of calcium but without liposomes; in these cases, almost no annexin was sedimented and crosslinking was evaluated in aliquots from the supernatants ("EGTA" and "No PS").

5 mM), we changed the phospholipid liposome composition from PS to an equimolecular mixture of phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine (PG:PC) as these liposomes do not self-aggregate at 5 mM calcium [Fig. 9(B)]. Binding of cA5 (100 nM) to 100 nm PG:PC vesicles ($\sim 130 \mu\text{M}$) in the presence of 5 mM CaCl_2 was complete and not affected by the presence of a 500-fold molar excess of HTS [Fig. 9(A)]. On the other hand, preincubation of cA5 with HTS in the presence of 5 mM CaCl_2 induced an HTS concentration-dependent inhibition of aggregation with around a 50% decrease in the initial aggregation rates and final ΔA^{360} values [Fig. 9(B,C)].

Discussion

Human annexin A5 has been reported as one of the members of this family of proteins that does not

induce vesicle aggregation. However, we have previously described the cloning and structural-functional characterization of its chicken counterpart and our experimental data suggested that cA5 does induce this process.^{20–22} The N-terminus of these proteins is considered as their major regulatory domain and several relevant differences are found in this extension between cA5 and hA5. Therefore, we decided to analyze whether the N-terminus of annexin A5 was responsible for the on/off switch of the vesicle aggregating activity. For this purpose, we purified recombinant cA5 and hA5 as well as a truncated mutant of the former that lacks residues 3–10 located in the N-terminus (dnt-cA5). In addition, we have cloned, expressed, and purified a chimera with the N-terminus of cA5 and the protein core of hA5. The comparative analysis of the secondary structure of the four recombinant proteins reveals that they are correctly folded and that the secondary structure and the thermal stability of the chimera are quite similar to those of hA5. Although the alteration of the N-terminus of annexin A5 does not significantly affect its secondary structure, some slight differences can be found in the binding capacity of the mutated annexins to PS vesicles. Calcium dependence for PS-binding is lower for the non-mutated proteins ($45\text{--}50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} for half-maximal binding), being around $20 \mu\text{M}$ higher for truncated dnt-cA5 and for the chimera cNt-hA5. Thus, alterations in the N-terminus are translated into subtle structural changes that affect the calcium and phospholipid binding sites located in the protein core on the opposite side of the molecule, as we have previously reported.^{5,21,22} Calcium concentrations over

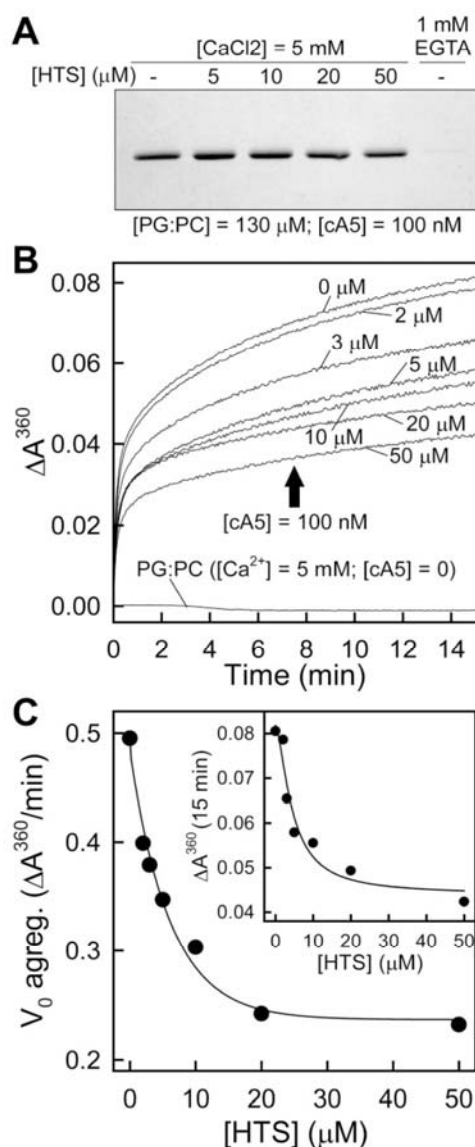


Figure 9. Inhibition of cA5-induced vesicle aggregation by heparin tetrasaccharide. The effect of HTS binding in cA5-induced vesicle aggregation was assayed after preincubation of cA5 with increasing concentrations of HTS in the presence of 5 mM CaCl_2 at 20°C . Afterwards, aggregation was triggered by addition of a concentrated stock of unilamellar 100 nm PG:PC liposomes. **(A)** Influence of HTS in the binding of cA5 to PG:PC vesicles was analyzed under identical experimental conditions to those used for the aggregation studies. 100 nm cA5-containing unilamellar vesicles were centrifuged in a Beckman Coulter Optima MAX-XP ultracentrifuge at $150,000g$ for 1 h at 4°C and the sediment and supernatants were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining and densitometric analysis of the protein bands. A negative control without calcium (1 mM EGTA) was included. Total cA5 sedimentation was achieved in the absence of HTS and only a minor reduction in sedimentation ($<7\%$) was observed at the highest HTS concentration used. **(B)** cA5-induced aggregation curves at increasing HTS concentration; no aggregation of PG:PC vesicles at 5 mM CaCl_2 was observed in the absence of cA5 either in the absence or presence of HTS. **(C)** Analysis of the apparent initial aggregation velocity and ΔA^{360} after 15 min as a function of HTS concentration.

100 μM induce total binding of the four proteins to PS-vesicles; these are the conditions used throughout the experiments herein reported.

The fluorescence emission spectra of Trp¹⁸⁷ in the absence of calcium and phospholipids correspond, in the four proteins, to a completely buried residue with emission maxima ranging from 316 to 319 nm. Addition of 200 μM CaCl_2 only affects hA5 spectrum with a red shift in the tryptophan emission maximum of 7 nm and an increase in the quantum yield. This effect is due to calcium-induced structural rearrangements in the protein core after calcium binding that increase the exposure of Trp¹⁸⁷. Lower calcium affinity of chicken annexins is likely responsible for the absence of this effect in cA5 and dnt-cA5.²¹ The cNt-hA5 chimera does not present such a significant shift as the intact hA5, what confirms the influence of the N-terminal extension on the protein core. Calcium affinity is strongly increased when ternary complexes with phospholipids are formed¹⁵ and this is reflected in immediate changes in the fluorescence spectra of all recombinant proteins. After addition of PS-vesicles, the Trp¹⁸⁷ emission maxima shift towards 340 nm and an increase in the quantum yield is observed, as has been already described for hA5.³² The increase in the quantum yield is due to the loss of the strong quenching of Trp¹⁸⁷ through hydrogen bonding to Thr²²⁴ that takes place in the calcium-free conformation. Upon calcium binding, mild acidification or interaction with acidic phospholipids, the loop connecting helices A and B in domain III changes its conformation exposing Trp¹⁸⁷ to the solvent or to the polar heads of the phospholipids breaking the interaction with Thr²²⁴.^{22,33}

cA5 binds to PS-vesicles in the presence of 200 μM Ca^{2+} with an apparent higher affinity than hA5, reflected in a lower value of the lipid to protein molar ratio for half maximal binding (20 for cA5 vs. 33 for hA5) and in a lower apparent dissociation constant (1.2 μM for cA5 vs. 4.1 μM for hA5). As in the sedimentation assays, fluorescence spectra confirm that alteration of the N-terminal domain modifies the affinity of the resulting annexin molecule for PS-vesicles. dnt-cA5 and the chimera show a higher apparent dissociation constant than cA5 and hA5, respectively. However, these changes do not modify the number of phospholipid molecules required in both leaflets for binding to the liposomes (around 20 in the four proteins).

Once we verified the correct folding of the recombinant proteins and their calcium-dependent binding to PS-vesicles, we checked their potential ability to induce vesicle aggregation. The data demonstrate that chicken annexin A5, in contrast to its human ortholog, is able to induce this process even at low protein and calcium concentrations, either at 20°C or at the normal body temperature of the chicken (around 42°C). Moreover, the results obtained with

the N-terminally truncated mutant and the chimera with the N-terminus of cA5 reveal that the short N-terminal extension of cA5 is essential for the induction of vesicle aggregation. However, additional regions of the protein core must be involved in this process, as truncation of the N-terminus does not completely abolish aggregation and replacement of the N-terminus of hA5 by that of cA5 does not yield a protein with the same aggregation ability as cA5.

As the apparent initial velocity values do not decrease at high protein concentration [Fig. 6(E)], the aggregation is probably triggered by the interaction between two proteins bound to different vesicles rather than by a single protein bridge. The kinetic analysis of the initial aggregation rates at high lipid to protein molar ratio indicates that this process is second order in protein concentration, which strongly supports this hypothesis. These data, together with cross-linking experiments show that cA5-induced membrane aggregation is most likely mediated by the dimerization of cA5 molecules on different vesicles. Taking into account that HTS binding to the concave exposed surface of annexin A5 strongly impairs vesicle aggregation, it could be suggested that dimerization takes place via these surfaces. HTS does not completely impair aggregation as it is not covalently bound to cA5; moreover, a high molar HTS excess over cA5 is required to observe inhibition of vesicle aggregation which indicates that the interaction between annexin molecules in opposing vesicles presents a lower dissociation constant than that of HTS binding to the concave face of cA5.

Cryo-electron microscopy of aggregated lipid vesicles in the presence of wild-type annexin A4, which is structurally and evolutionary similar to annexin A5,^{2,34} shows a separation compatible with two layers of membrane-bound annexin A4.⁷ In contrast, annexins A1 and A2 seem to be able to induce membrane aggregation via different mechanisms in which the N-terminal domain plays an important role: membrane bridging through heterotetramers with proteins of the S100 family,¹⁵ formation of dimers via interaction through the N-terminal domains of monomeric annexins, as suggested for annexin A4 and by us for chicken annexin A5,¹⁶ or interaction of one molecule with two adjacent membranes simultaneously.^{9,10,17}

Why does cA5 induce membrane aggregation, whereas hA5 does not? The N-terminal extension seems to be the major responsible for this different behavior as the chimera with the protein core of hA5 and the N-terminus of cA5 recovers the ability to aggregate membranes. In addition, deletion of eight amino acids from the N-terminus of cA5 strongly impairs its membrane bridging ability. One of the main differences between the N-terminus of both annexins is the higher negative charge in hA5 due to the substitution of Ala¹¹ and Ala¹⁷ in cA5 by Asp¹¹ and Glu¹⁷ accompanied by the replacement of Lys³ by Gln³

(see Fig. 10). Comparison with the N-terminus of mammalian annexin A4, which induces vesicle aggregation,⁷ reveals the absence of negatively charged residues and the presence of alanines in positions equivalent to those in cA5. An increase in the negative charge in the N-terminus of bovine annexin A4 (bA4) due to phosphorylation of Thr⁷ (or simulated by point mutation Thr⁷ to Asp) has been reported to induce the release of the N-terminus from the protein core and impair the ability of this annexin to promote membrane aggregation.⁷ A similar observation has been reported for annexin A2, where the replacement of Ser²¹ or Ser²⁵ in the N-terminal extension by glutamic acid blocks the Ca²⁺-dependent vesicle aggregation ability of annexin A2 by impairment of protein–protein contacts through the concave face of the annexin A2 monomers.¹⁵ Thus, the lack of acidic residues (Asp¹¹ and Glu¹⁷) and the presence of Lys³ and Arg⁶ in cA5 N-terminal extension may be, at least partially, responsible for the membrane-aggregation ability detected in this protein and not present in the human ortholog. In fact, in dnt-cA5, where these two basic residues are not present, the ability to aggregate vesicles is significantly reduced. Additional regions of the protein may be involved in the lack of ability of hA5 to induce aggregation, as dnt-cA5 is still able to induce aggregation at high concentration and the chimera cNt-hA5 shows lower aggregation ability than the wild type chicken annexin. cA5-induced vesicle aggregation is probably dependent on the interaction between cA5 molecules through their concave faces. This region includes the N-terminal extension, the loop between domains II and III, and the C-helices from each domain of the annexin core. Interestingly, helix C from domain II shows significant charge differences between cA5 and hA5, with several acidic residues in hA5 not present in cA5 (hA5: Glu¹²⁰, Glu¹³⁰, Glu¹³¹; cA5: Ala¹²⁰, Met¹³⁰, Gln¹³¹), and Gly¹⁶⁶ replacing Arg¹⁶⁶ in cA5 (Fig. 10). In bA4, that induces vesicle aggregation,⁷ residues equivalent to 130–132 in hA5 do not present negative charge (Gln¹²⁹, Leu¹³⁰, and Gln¹³¹). These additional negatively charged residues in the hA5 could further impair the interaction between the concave faces of hA5 due to electrostatic repulsions. The ability of hA5 to induce Ca²⁺-dependent aggregation of PS-vesicles at mild acidic pH (in which acid lateral chains from aspartic or glutamic acid residues do not present negative charge)³⁶ strongly supports this model.

It is quite surprising that the two annexin A5 orthologs in human and chicken, which present a 78.1 identity and 86.9% similarity in their sequence, show a completely different behavior regarding such an important function as membrane aggregation. It has been previously reported that chicken annexin A5 resembles mammalian annexin A4 in some of its immunological and physicochemical properties, such as its apparent molecular mass and isoelectric point

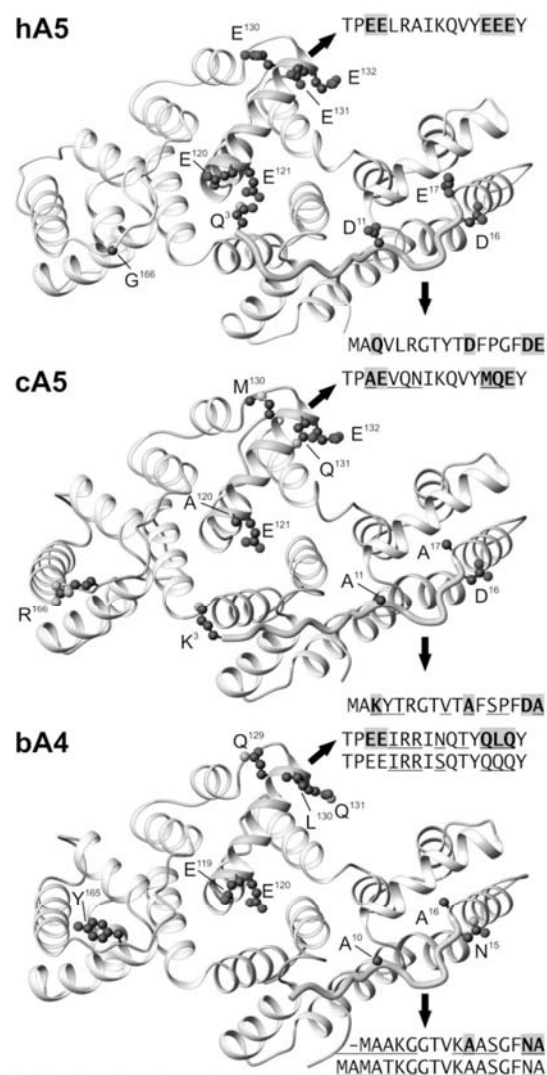


Figure 10. Three-dimensional structure of human and chicken annexin A5 and bovine annexin A4. X-Ray crystallography co-ordinates were obtained from the Protein Data Bank (hA5: 1ANX, residues 3–319; cA5: 1ALA, residues 3–320; bA4: 1ANN, residues 5–319). Molecules are viewed from the concave face and the lateral chains from the most significant residue changes between hA5 and cA5 are shown in a ball-and-stick style (Asp¹⁶ and Glu¹³² are also shown). Sequences corresponding to the N-terminal extensions and to helices IIC are shown; differences with hA5 are underlined and residues represented in a ball-and-stick style are gray-shaded. The sequences corresponding to the N-terminus and helix IIC of human annexin A4 are aligned with those from bA4. Residue numbers are assigned according to cDNA translation and thus, N-terminal methionine is Met¹ even though it is not present in the wild-type proteins. The figure was prepared using the MOLMOL program.³⁵

(5.6 and 5.7 in cA5 and human annexin A4, respectively, versus 4.7 in hA5).³⁷ In fact, cA5 was initially misidentified as the chicken ortholog of annexin A4.³⁸

In addition, annexin A4 as well as A3 and A9 genes are absent in birds (build 2.1 of the chicken genome assembly; Washington University School of Medicine in St. Louis). cA5 presents a high sequence similarity with annexins A4 and A3 (57.3% identity and 68.5% similarity with hA4, and 49.5% identity and 63.5% similarity with hA3). Thus, one could speculate that chicken annexin A5 may have evolved to gain functions that these annexins exert in other vertebrates. Calcium-dependent membrane aggregation ability may be one of this evolutionary gained functions, as this property is not present in the most ancient member of vertebrate annexins, annexin A13.^{12,39}

Methods

Construction of chimeric cNt-hA5 expression vector

The cDNA from the N-terminus of chicken annexin A5 was fused to that from the core of human annexin A5 using three PCR reactions (Taq Advantage2 kit; Clontech, Mountain View, CA) according to the splicing by overlap extension technique⁴⁰ illustrated in Figure 1(A). Constructs pACIIE^{20,21} and pHA5.E²² were used as initial cA5 and hA5 cDNA templates, respectively. The final amplified fragment was first cloned into pCR2.1 (TA cloning kit; Clontech) and then into the *NcoI/Hind III* sites of the pTrec99A expression vector (Pharmacia; Buckinghamshire, UK). Constructs were sequenced in both directions to verify the absence of artifacts.

Protein expression and purification

Recombinant plasmids pACIIE (cA5), pdntACIIE (dnt-cA5), pHA5.E (hA5), and pcNt-hA5.E (cNt-hA5) were transformed into JA221 *E. coli* strain. Protein production and purification was essentially performed as previously described^{12,21} using the ability of the four recombinant proteins to reversibly interact with PS-enriched liposomes and a final chromatographic step in DEAE-cellulose. Pure protein preparations were dialyzed against 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.1M NaCl, filtered through 0.22 μ m membranes, and stored at 4°C until use. Protein concentration was determined by amino acid analysis (Beckman 6300 analyzer) or by UV-spectroscopy using molar extinction coefficients at 280 nm of 22,155, 20,720, 21,842, and 21,829 M⁻¹ cm⁻¹ for cA5, dnt-cA5, hA5, and cNt-hA5, respectively. Purity of the protein preparations was checked by SDS-PAGE followed by Coomassie blue or silver nitrate staining combined with Western blot analysis using polyclonal antibodies directed against human or chicken annexin A5 obtained in our laboratory.^{41,42}

Circular dichroism measurements

CD-spectra were registered in a Jasco J-715 spectropolarimeter (Neslab RTE-111 thermostat) at 20°C in

20 mM Hepes, pH 7.4, containing 0.1M NaCl, between 190 and 260 nm in 0.05 cm-pathlength thermostated cuvettes and using protein preparations around 0.3 mg/mL. All spectra were averaged at least over six scans and were corrected by subtracting buffer contribution from parallel spectra in the absence of protein; units are expressed as mean residue weighted molar ellipticities ($[\theta]_{MRW}$). Melting curves were determined monitoring ellipticity changes at 208 nm between 20 and 80°C and increasing temperature at 60°C/h^{11,12}. Melting temperatures (T_m) were calculated from the maximum of the first derivative of the unfolding curves.

Binding to phospholipids and vesicle aggregation assays

Unilamellar vesicles were prepared using bovine brain PS (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) or an equimolecular mixture PG:PC (Avanti Polar Lipids and Sigma, Alcobendas, Spain, respectively; PC from egg yolk and PG derived from egg yolk PC) by hydration of a thin dried-lipid film in 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.1M NaCl, followed by extrusion through polycarbonate filters of either 100 or 400 nm pore diameter (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada). Small unilamellar vesicles (50 nm) were prepared from freshly obtained 400 nm vesicles by further extrusion through polycarbonate filters with the corresponding pore diameter.

Annexin interaction with 400 nm vesicles was carried out at a 600:1 lipid/protein molar ratio with variable calcium concentrations at 20°C for 15 min essentially as previously described.^{11,12} The final mixture (300 μ L) was ultracentrifuged at 134,000g and 4°C for 1 h (Airfuge Beckman). After separation of supernatant and pellet, equivalent aliquots were analyzed by SDS-PAGE and proteins were detected by Coomassie blue staining; gels were scanned and densitometred on a photodocumentation system from UVitec (Cambridge, U.K.) and using the UVIBand V.97 software. The percentage of bound annexin was determined from at least three independent experiments in which the supernatants and pellets were analyzed in the same gels.

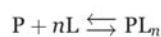
Vesicle aggregation studies were performed recording absorption at 360 nm immediately after the addition of calcium to a mixture of PS unilamellar vesicles (100 nm; 0.1 mg/mL) and the corresponding annexin at 20°C or 42°C. Calcium was added from a CaCl₂ stock solution and absorption was registered in a thermostatically controlled cuvette for at least 15 min.^{11,12} The stability of PS-vesicles in the presence of calcium concentrations up to 500 μ M was confirmed by the lack of self-aggregation.

Inhibition of cA5 induced vesicle aggregation by HTS (Iduron, Manchester, UK) was carried out in a slightly different manner. First, a 10 min incubation of cA5 with HTS was carried out at 20°C in the presence of 5 mM CaCl₂ at different molar ratios; afterwards,

the reaction was triggered by addition of 100 nm unilamellar PG:PC vesicles (which do not self-aggregate in the presence of 5 mM CaCl_2 as occurs with PS vesicles) from a concentrated stock (2 mg/mL) to a final concentration of 0.1 mg/mL (around 130 μM). As before, aggregation was monitored at 20°C recording absorption at 360 nm immediately after addition of the vesicles.

Fluorescence emission spectroscopy

Fluorescence emission spectra were recorded between 300 and 420 nm in an SLM Aminco 8000C spectrofluorimeter at 20°C, with excitation wavelength of 295 nm and using a 0.4-cm excitation pathlength and 1.0-cm emission pathlength cuvette. Scattering was minimized by crossed Glan-Thompson polarizers. The stability of the 50 nm unilamellar PS-vesicles was verified by monitorization of the Rayleigh scattering at 90° (obtained from the maximum at 295 nm of spectra recorded at this excitation wavelength) in the absence of protein and in the presence of 200 μM CaCl_2 . Annexin binding curves to PS-vesicles were obtained plotting the fluorescence intensity ratio at wavelengths corresponding to the emission maxima from completely bound or free annexin at increasing lipid to protein molar ratios in the presence of 200 μM CaCl_2 .^{11,12} The binding results have been analyzed by considering the following equilibrium:



where P is the protein, L is the free lipid sites, and n is the number of phospholipid molecules involved at each binding site. Thus, an apparent dissociation constant (K_d) can be defined as a function of the concentration of bound ($[P]_b$) and free ($[P]_f$) protein, total PS ($[L]_t$), and n , and the following equation can be deduced:

$$\frac{[L]_t}{[P]_b} = \frac{K_d n}{[P]_f} + n$$

A plot of $[L]_t/[P]_b$ vs. $1/[P]_f$ allows the calculation of both apparent K_d and n .

Protein crosslinking in the presence of PS-vesicles

Annexin crosslinking in the presence of 100 nm PS-vesicles (600:1 and 100:1 lipid/protein molar ratios; 0.5–1.5 μM protein) was carried out after a 15 min protein-vesicle interaction in the presence 200 μM CaCl_2 using BS³ (bis[sulfosuccinimidyl]suberate; Pierce, Rockford, IL) in a 125 molar excess for 30 min, and was stopped by addition of Tris, pH 7.4 (0.1M final concentration). After centrifugation for 1 h at 134,000g, the pellet was resuspended and analyzed by SDS-PAGE under reducing condition. Controls were

carried out without PS-vesicles in the presence of 200 μM CaCl_2 and with liposomes in the absence of calcium (1 mM EGTA); in these controls, no annexin was found in the pellets and the gels show crosslinked annexin in the supernatants.

Conclusion

In conclusion, we demonstrate for the first time that chicken annexin A5 is able to induce vesicle aggregation, whereas mammalian annexin A5 cannot, even though these molecules present only few differences in their amino acid sequence. Aggregation seems to involve protein to protein interactions between the concave surfaces of annexin molecules in opposing membranes. Electrostatic repulsions, mainly involving negatively charged residues in the N-terminal domain and to a lower extent in helix IIC, seem to be responsible for the inability of hA5 to induce vesicle aggregation. This property may allow cA5 to participate in additional physiological processes such as membrane trafficking.

References

- Gerke V, Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82:331–371.
- Moss SE, Morgan RO (2004) The annexins. *Genome Biol* 5:2.19.1–2.19.8.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:449–461.
- Turnay J, Lecona E, Guzmán-Aránguez A, Pérez-Ramos P, Fernández-Lizarbe S, Olmo N, Lizarbe MA (2003b) Annexins: structural characteristics of the N-terminus and influence on the overall structure of the protein. *Recent Res Dev Biochem* 4:79–95.
- Turnay J, Guzmán-Aránguez A, Lecona E, Pérez-Ramos P, Fernández-Lizarbe S, Olmo N, Lizarbe MA (2003a) Influence of the N-terminal domain of annexins in their functional properties. *Recent Res Dev Biochem* 4:53–78.
- Blackwood RA, Ernst JD (1990) Characterization of Ca^{2+} -dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *Biochem J* 266:195–200.
- Kaetzel MA, Mo YD, Mealy TR, Campos B, Bergsma-Schutter W, Brisson A, Dedman JR, Seaton BA (2001) Phosphorylation mutants elucidate the mechanism of annexin IV-mediated membrane aggregation. *Biochemistry* 40:4192–4199.
- Naidu DG, Raha A, Chen XL, Spitzer AR, Chander A (2005) Partial truncation of the NH2-terminus affects physical characteristics and membrane binding, aggregation, and fusion properties of annexin A7. *Biochim Biophys Acta* 1734:152–168.
- Hu NJ, Bradshaw J, Lauter H, Buckingham J, Solito E, Hofmann A (2008) Membrane-induced folding and structure of membrane-bound annexin A1 N-terminal peptides: implications for annexin-induced membrane aggregation. *Biophys J* 94:1773–1781.
- Zibouche M, Vincent M, Illien F, Gallay J, Ayala-Sanmartín J (2008) The N-terminal domain of annexin 2 serves as a secondary binding site during membrane bridging. *J Biol Chem* 283:22121–22127.
- Lecona E, Turnay J, Olmo N, Guzmán-Aránguez A, Morgan RO, Fernández MP, Lizarbe MA (2003) Structural

- and functional characterization of recombinant mouse annexin A11: influence of calcium binding. *Biochem J* 373(Part 2):437–449.
12. Turnay J, Lecona E, Fernández-Lizarbe S, Guzmán-Arangué A, Fernández MP, Olmo N, Lizarbe MA (2005). Structure-function relationship in annexin A13, the founder member of the vertebrate family of annexins. *Biochem J* 389(Part 3):899–911.
 13. Rothhut B (1997) Participation of annexins in protein phosphorylation. *Cell Mol Life Sci* 53:522–526.
 14. Bitto E, Cho W (1999) Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I. *Biochemistry* 38:14094–14100.
 15. Ayala-Sanmartín J, Vincent M, Sopkova J, Gallay J (2000) Modulation by Ca^{2+} and by membrane binding of the dynamics of domain III of annexin 2 (p36) and the annexin 2(p11) complex (p90): implications for their biochemical properties. *Biochemistry* 39:15179–15189.
 16. Ayala-Sanmartín J, Zibouche M, Illien F, Vincent M, Gallay J (2008) Insight into the location and dynamics of the annexin A2 N-terminal domain during Ca^{2+} -induced membrane bridging. *Biochim Biophys Acta* 1778:472–482.
 17. Rosengarth A, Luecke H (2003) A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J Mol Biol* 326:1317–1325.
 18. Ernst JD, Hoye E, Blackwood RA, Mok TL (1991) Identification of a domain that mediates vesicle aggregation reveals functional diversity of annexin repeats. *J Biol Chem* 266:6670–6673.
 19. Andree HA, Willems GM, Hauptmann R, Maurer-Fogy I, Stuart MC, Hermens WT, Frederik PM, Reutelingsperger CP (1993) Aggregation of phospholipid vesicles by a chimeric protein with the N-terminus of annexin I and the core of annexin V. *Biochemistry* 32:4634–4640.
 20. Turnay J, Pfannmüller E, Lizarbe MA, Bertling WM, von der Mark K (1995) Collagen binding activity of recombinant and N-terminally modified annexin V(anchurin CII). *J Cell Biochem* 58:208–220.
 21. Arboledas D, Olmo N, Lizarbe MA, Turnay J (1997) Role of the N-terminus in the structure and stability of chicken annexin V. *FEBS Lett* 416:217–220.
 22. Turnay J, Olmo N, Gasset M, Iloro I, Arrondo JL, Lizarbe MA (2002a) Calcium-dependent conformational rearrangements and protein stability in chicken annexin A5. *Biophys J* 83:2280–2291.
 23. Perczel A, Park K, Fasman GD (1992) Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. *Anal Biochem* 203:83–93.
 24. Hucho F, Mullner H, Sund H (1975) Investigation of the symmetry of oligomeric enzymes with bifunctional reagents. *Eur J Biochem* 59:79–87.
 25. de los Ríos V, Mancheño JM, Martínez del Pozo A, Alfonso C, Rivas G, Oñaderra M, Gavilanes JG (1999) Sticholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*, is a monomer-tetramer associating protein. *FEBS Lett* 455:27–30.
 26. Oling F, Santos JS, Govorukhina N, Mazeret-Dubut C, Bergsma-Schutter W, Oostergetel G, Keegstra W, Lambert O, Lewit-Bentley A, Brisson A (2000) Structure of membrane-bound annexin A5 trimers: a hybrid cryo-EM–X-ray crystallography study. *J Mol Biol* 304:561–573.
 27. Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A (2001) Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin A5 two-dimensional crystals. *J Struct Biol* 133:55–63.
 28. Mo Y, Campos B, Mealy TR, Commodore L, Head JF, Dedman JR, Seaton BA (2003) Interfacial basic cluster in annexin V couples phospholipid binding and trimer formation on membrane surfaces. *J Biol Chem* 278:2437–2443.
 29. Ladokhin AS, Haigler HT (2005) Reversible transition between the surface trimer and membrane-inserted monomer of annexin 12. *Biochemistry* 44:3402–3409.
 30. Patel DR, Isas JM, Ladokhin AS, Jao CC, Kim YE, Kirsch T, Langen R, Haigler HT (2005) The conserved core domains of annexins A1, A2, A5, and B12 can be divided into two groups with different Ca^{2+} -dependent membrane-binding properties. *Biochemistry* 44:2833–2844.
 31. Capila I, Hernaiz MJ, Mo YD, Mealy TR, Campos B, Dedman JR, Linhardt RJ, Seaton BA (2001) Annexin V–heparin oligosaccharide complex suggests heparan sulfate-mediated assembly on cell surfaces. *Structure* 9:57–64.
 32. Sopkova J, Vincent M, Takahashi M, Lewit-Bentley A, Gallay J (1999) Conformational flexibility of domain III of annexin V at membrane/water interfaces. *Biochemistry* 38:5447–5458.
 33. Sopkova-De Oliveira Santos J, Vincent M, Tabaries S, Chevalier A, Kerboeuf D, Russo-Marie F, Lewit-Bentley A, Gallay J (2001) Annexin A5 D226K structure and dynamics: identification of a molecular switch for the large-scale conformational change of domain III. *FEBS Lett* 493:122–128.
 34. Zanotti G, Malpeli G, Gliubich F, Folli C, Stoppini M, Olivi L, Savoia A, Berni R (1998) Structure of the trigonal crystal form of bovine annexin IV. *Biochem J* 329(Part 1):101–106.
 35. Koradi R, Billeter M, Wuthrich K (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 14:51–55.
 36. Hoekstra D, Buist-Arkema R, Klappe K, Reutelingsperger CP (1993) Interaction of annexins with membranes: the N-terminus as a governing parameter as revealed with a chimeric annexin. *Biochemistry* 32:14194–14202.
 37. Boustead CM, Brown R, Walker JH (1993) Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver. *Biochem J* 291(Part 2):601–608.
 38. Boustead CM, Walker JH, Kennedy D, Waller DA (1991) Crystallization and preliminary X-ray studies of annexin IV(endonexin), a calcium-dependent phospholipid-binding protein. *FEBS Lett* 279:187–189.
 39. Iglesias JM, Morgan RO, Jenkins NA, Copeland NG, Gilbert DJ, Fernandez MP (2002) Comparative genetics and evolution of annexin A13 as the founder gene of vertebrate annexins. *Mol Biol Evol* 19:608–618.
 40. Heckman KL, Pease LR (2007) Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2:924–932.
 41. Turnay J, Olmo N, Lizarbe MA, von der Mark K (2002b) Changes in the expression of annexin A5 gene during in vitro chondrocyte differentiation: influence of cell attachment. *J Cell Biochem* 84:132–142.
 42. Guzmán-Arangué A, Olmo N, Turnay J, Lecona E, Pérez-Ramos P, López de Silanes I, Lizarbe MA (2005) Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem* 94:178–193.

4.2.4. Regulación del promotor de la MMP-11 por butirato

La MMP-11 es un miembro de la familia de las metaloproteinasas de la matriz que se ha relacionado con progresión tumoral y mal pronóstico. Aunque inicialmente fue descrita únicamente en células del estroma circundantes al tumor, en este trabajo se ha detectado su expresión en células de adenocarcinoma de colon humano de origen epitelial. Además se ha comprobado en este sistema que los niveles de MMP-11 se modifican en presencia de butirato. Por tanto, se ha procedido a estudiar los mecanismos a través de los cuales este agente es capaz de regular la transcripción de este gen.

Artículo 6: Juan I. Barrasa, Nieves Olmo, Angélica Santiago-Gómez, Emilio Lecona, Patrick Anglard, Javier Turnay y M^a Antonia Lizarbe. “Histone deacetylase inhibitors upregulate MMP11 gene expression through Sp1/Smad complexes in human colon adenocarcinoma cells”

Biochimica et Biophysica Acta (Molecular Cell Research)
1823:570-581 (2012).

En este trabajo se ha comprobado que la MMP-11 se expresa no sólo en células del estroma, sino también en diferentes líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2, HT-29 y BCS-TC2). Además, el tratamiento de las células BCS-TC2 con butirato y TSA (ambos inhibidores de la actividad HDAC) promueve un incremento en la expresión de la proteína, principalmente en su forma activa. Se ha detectado que estos cambios se deben a una activación transcripcional, con el correspondiente aumento en los niveles de mRNA. Los ensayos de luciferasa con diferentes construcciones del promotor de la MMP-11 ponen de manifiesto que existen elementos de respuesta a butirato en la región proximal (-110/+13). Los ensayos de retardo en gel e inmunoprecipitación de cromatina demostraron que el factor de transcripción Sp1 se une a cajas ricas en GC presentes en esta región. El tratamiento con butirato no altera los niveles de Sp1 ni su estado de acetilación, pero sí su capacidad para formar complejos con Smad2. Así, el butirato incrementa la acetilación de Smad2 promoviendo su interacción con Sp1. La unión de este complejo Sp1/Smad2 al promotor de la MMP-

11 es fundamental para la actividad transcripcional del gen, así como para la activación por butirato, como demuestran los ensayos en presencia de mitramicina (inhibidor de la unión de Sp1 al DNA) y el empleo de mutantes en los que se eliminaron las cajas GC. Por otra parte, también se ha estudiado la implicación de diferentes rutas de señalización en estos procesos, comprobándose mediante el uso de diferentes inhibidores específicos de MAPK que la ruta de ERK1/2 desempeña un papel fundamental en la respuesta de este gen a butirato.

Aportación personal

En este trabajo se ha participado en el estudio de los niveles proteicos de MMP-11 en diferentes líneas celulares en respuesta a varios agentes. También se han realizado los ensayos de activación transcripcional con las diferentes construcciones del promotor [natural (*wild-type*) o mutado en las cajas GC], tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con butirato y TSA en presencia de diferentes inhibidores (mitramicina e inhibidores de MAPK). Se han llevado a cabo los ensayos de retardo en gel e inmunoprecipitación de cromatina, así como los experimentos de coimmunoprecipitación.



Histone deacetylase inhibitors upregulate *MMP11* gene expression through Sp1/Smad complexes in human colon adenocarcinoma cells

Juan I. Barrasa^a, Nieves Olmo^a, Angélica Santiago-Gómez^a, Emilio Lecona^a, Patrick Anglard^b, Javier Turnay^a, M. Antonia Lizarbe^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemistry, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

^b Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC), Université de Strasbourg, CNRS, UMR 7237, 67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2011

Received in revised form 25 November 2011

Accepted 20 December 2011

Available online 29 December 2011

Keywords:

Butyrate

Colon adenocarcinoma

Histone-deacetylase inhibitor

MAP kinase

Metalloproteinase

ABSTRACT

MMP-11 (stromelysin-3) is a matrix metalloproteinase associated with tumor progression and poor prognosis. Its expression was initially described exclusively in stromal cells surrounding tumors, but more recently it has also been detected in macrophages and hepatocarcinoma cells. Here we show MMP-11 expression in human epithelial colon adenocarcinoma cell lines (Caco-2, HT-29 and BCS-TC2). Treatment of BCS-TC2 cells with butyrate and trichostatin A (TSA) (histone deacetylase inhibitors) increases *MMP11* promoter activity and protein expression. Using electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and supershift assays, we demonstrate for the first time that Sp1 is able to bind to the GC-boxes within the *MMP11* proximal promoter region; this binding has been confirmed by chromatin immunoprecipitation. Sp1 is involved in *MMP11* basal expression and it is essential for the upregulation of transcription by histone deacetylase inhibitors as deduced from mutant constructs lacking the Sp1 sites and by inhibition of its binding to the promoter with mithramycin. This regulation requires the formation of Sp1/Smad2 heterocomplexes, which is stimulated by an increase in the acetylation status of Smad after butyrate or TSA treatments. We have also found that ERK1/2-mitogen-activated protein kinase (MAPK), but not p38-MAPK or JNK, is involved in the upregulation of *MMP11* by HDAC inhibitors.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a well conserved family of zinc-dependent endopeptidases involved in the degradation of the extracellular matrix during remodeling processes of both normal and pathological tissues, such as embryogenic development, wound healing, inflammation, angiogenesis or tumor progression [1]. The members of this family have a conserved catalytic domain, a signal peptide which directs the secretion process and a propeptide region to maintain enzyme latency. The majority of MMPs have a hemopexin-like domain that is responsible for the substrate specificity and for the interaction with endogenous inhibitors (TIMPs, tissue inhibitor of metalloproteinases) [1,2]. MMPs are either secreted or anchored to the cell membrane, where they exert their catalytic activity over substrates within the pericellular space.

The expression and activation of MMPs are tightly regulated. The activity of MMPs is controlled at several levels to ensure that their degradative functions are confined to those places or situations

where it is necessary. The MMPs are expressed as inactive proenzymes that require the removal of the propeptide region to switch on their protease activity. Alternatively, MMP-11, MMP-23, MMP-28 and membrane-type MMPs can be activated intracellularly by furin-like serine proteases and then either secreted or bound to the cell surface [3]. MMPs are strongly regulated by tissue specific location or by inactivation by TIMPs [2].

Human MMP-11, also known as stromelysin-3, differs drastically from other MMPs in its catalytic targets: β -casein, insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1), α 2-macroglobulin, serine proteinase inhibitors (such as α 1-proteinase inhibitor, α 1PI, and α 2-antiplasmin), the laminin receptor and type VI collagen [4]. In addition to substrate specificity and proteolytic activation, MMP-11 differs from other MMPs in its transcriptional regulation [5,6]. Its expression is stimulated by retinoic acid through a retinoic acid-response element (RARE) located in its proximal promoter in which there is no AP-1 site [7].

MMP-11 was first described in stromal cells surrounding breast neoplastic cells [8] and was later detected in the stroma of other tumors, such as non-small cell lung cancer [9,10] or colorectal carcinomas [11], as well as in macrophages [12], and in Hca-F mouse hepatocarcinoma cells [13]. High levels of MMP-11 protein and mRNA have been correlated with a poor prognosis in carcinomas; in addition, it has been described as a predictive tumor biomarker in

Abbreviations: HDAC, histone deacetylase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; TSA, trichostatin A.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4256; fax: +34 91 394 4159.

E-mail address: lizarbe@bbm1.ucm.es (M.A. Lizarbe).

serum [14,15]. The procarcinogenic activity of MMP-11 seems to be due to its proteolytic activity, as suggested by the results obtained *in vivo* using MMP-11 catalytic inactive mutants [16], although the molecular mechanisms involved are yet unknown. One hypothesis is that the degradation of protease inhibitors, as α 1PI (elastase inhibitor) or α 2-antiplasmin, by MMP-11 may increase tissue damage by activation of pro-MMPs including pro-MMP-11 [17]. Moreover, it has been suggested that MMP-11 improves cancer cell survival and could inhibit apoptosis [18,19]. Regarding the physiological role of MMP-11 little is known although several authors have suggested its involvement in development and organ remodeling being these processes correlated with apoptosis induction (for review see [20]).

Butyrate is a natural histone deacetylase (HDAC) inhibitor produced in the colon by fermentation of diet-fiber, where it represents the main energy source for colonocytes *in vivo*. It is essential for the maintenance of the colonic epithelium homeostasis and is able to induce cell cycle arrest, differentiation and apoptosis in several normal and transformed cell lines [21,22]. These effects are believed to result from changes in the gene expression profile promoted by the HDAC inhibition [22,23]. There are mainly two types of genes whose expression is regulated by butyrate: first, genes characterized by the presence of CCAAT boxes on their promoters that are regulated by NF- κ B (Nuclear transcription factor κ B) and C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) in response to butyrate and other HDAC inhibitors [24]; second, genes with GC-boxes on their promoters that are mainly regulated by Sp1/Sp3 (i.e. p21) [25]. In addition, trichostatin A (TSA) is an antifungal antibiotic derived from *Streptomyces* and a potent reversible HDAC inhibitor that also modifies gene expression profiles.

In this work we present evidence that MMP-11 is expressed not only in stromal cells but also in human colon adenocarcinoma cells (HT-29, Caco-2 and BCS-TC2), and we have further studied the expression of MMP11 in the BCS-TC2 cell line. These epithelial-like cells are non-tumorigenic and poorly differentiated, and butyrate treatment induces growth arrest, differentiation and apoptosis [21]. Here we propose Sp1 as an important transcription factor regulating the basal expression of the MMP11 gene in cooperation with Smad2. Taking into account that the acetylation status of histones and transcription factors is probably involved in the transcriptional regulation of MMP genes [26], we have analyzed the effect of HDAC inhibitors in the expression of this MMP. We provide evidence that MMP11 promoter is activated after treatment with butyrate or TSA through two different mechanisms: i) the increased acetylation of Smad2, which promotes the formation of a Sp1/Smad2 complex bound to the MMP11 proximal promoter region and, ii) the activation of ERK1/2-mitogen-activated protein kinase (MAPK).

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatments

The establishment and characterization of the human colon adenocarcinoma BCS-TC2 cell line has been previously described [27]. BCS-TC2 epithelial cells were obtained in our laboratory from a poorly differentiated human colon adenocarcinoma; they present a low differentiation degree and null tumorigenicity *in vivo*. The human epithelial colon adenocarcinoma cell lines HT-29 (ATCC: HTB38) and Caco-2 (ATCC: HTB37), as well as the human rhabdomyosarcoma cell line RD (ATCC: CCL-136) were also used. Routinely, cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 g/l glucose, and supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (10% for Caco-2 and RD cells), penicillin (50 IU/ml), streptomycin (50 μ g/ml) and glutamine (300 μ g/ml). Cell harvesting was performed by trypsinization.

Butyrate (Sigma, Alcobendas, Spain) was prepared in standard culture medium and filter sterilized, and was used at 4 mM unless otherwise stated. TSA (Sigma) was prepared in DMSO and added to

the cells at 0.5 μ M. Mithramycin A (Sigma) was prepared in methanol and added to the cells at 200 nM. Cultures containing the same amount of DMSO or methanol were used as controls of TSA and mithramycin A treatments, respectively. Incubation with the different agents was performed on exponentially growing cells (2–3 days after seeding) for 24 or 48 h.

Conditioned media were obtained after incubation of subconfluent (~80% confluence) human colon adenocarcinoma cells in serum-free media for 48 h, and in the case of BCS-TC2 cells with the corresponding treatments. Conditioned media from RD cells were collected after 24 h incubation in the absence or presence of 10 ng/ml 4α -phorbol 12-myristate 13-acetate, 1 μ M all-*trans* or 9-*cis* retinoic acid (PMA, t-RA or 9c-RA, respectively; all from Sigma). All media were collected and concentrated 40-fold by centrifugation with Vivaspins concentrators 10,000 MWCO (Vivascience, Sartorius, Madrid, Spain). α 2-Macroglobulin entrapment assay was performed as described previously [17]. This protein tightly binds to and entraps the active form of several MMPs. Briefly, aliquots of MMP-11-containing conditioned media were incubated with 10 μ g of human α 2-macroglobulin (Sigma) for 12 h at 37 °C. Samples were then analyzed by Western blot.

2.2. Antibodies

For Western blot, immunoprecipitation, and ChIP analyses, the following antibodies were used: mouse monoclonal antibodies anti-human MMP-11 (SL3-05), MMP-2 (42-5D11) (both from Calbiochem, Madrid, Spain), acetyl-Lysine (4G12, Cell Signaling, Danvers, MA), anti-human p53 (Ab-6 clone DO-1, ThermoScientific, Madrid, Spain), and lamin B1 (MBL, Woburn, MA), and goat polyclonal antibodies anti-human Sp1 (PEP2), Sp3 (D-20), MAZ (A-17), ZBP-89 (S-15), Smad2/3 (E-20), phospho-Smad2/3 (Ser 423/425, sc-11769) (all from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), phospho-Smad3, Ser423/425 (C25A9; Cell Signaling, Beverly, MA), and phospho-Sp1 (phospho T453; Abcam, Cambridge, UK). Peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG was from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) and goat anti-mouse IgG was from Thermo Scientific (Madrid, Spain). Peroxidase-conjugated mouse TrueBlot ULTRA anti-mouse IgG and peroxidase-conjugated goat TrueBlot anti-goat IgG were from eBiosciences (Hatfield, UK). For flow cytometry, the primary goat polyclonal antibody anti-human MMP-11 (C-20, Santa Cruz Biotechnology) and FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) monoclonal antibody were used.

2.3. Western blot analysis of nuclear extracts and conditioned media

Nuclear extracts were obtained as described [24]. Briefly, harvested cells ($20\text{--}30 \times 10^6$) were washed twice with ice-cold PBS, resuspended in 180 μ l of ice-cold hypotonic lysis buffer (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA) containing protease and phosphatase inhibitors (PMSF, aprotinin, pepstatin A, leupeptin, Na_2VO_4 , NaF, β -glycerophosphate, dithiothreitol, all at 1 μ M final concentration), incubated on ice for 10 min followed by addition of 20 μ l of Nonidet P-40; after 3 min at room temperature, cells were vortexed and the cytosolic fraction was obtained by centrifugation for 5 min at 2500 \times g. The nuclear pellet was resuspended in 60 μ l of high-salt extraction buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA containing protease and phosphatase inhibitors) and incubated with shaking at 4 °C for 1 h. The nuclear extract was centrifuged for 5 min at 16,000 \times g and the supernatant stored at -80 °C. Protein concentration was determined using the Bradford assay.

Nuclear protein extracts (20 μ g) or conditioned media (2 μ g) were resolved by SDS-PAGE after heat denaturing in the presence or absence of 5% β -mercaptoethanol, respectively. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and analyzed by Western blot as

described elsewhere [28]. Densitometric analysis was performed obtaining volumograms using Multi Gauge v3.0 (Fujifilm). Data from nuclear extracts were normalized against the intensity of the bands corresponding to lamin B1, and data from conditioned media against MMP-2 bands (both lamin B1 expression and levels of secreted MMP-2 were unaltered upon HDAC-inhibitor treatments under the experimental conditions used).

2.4. Quantitative real-time PCR

Total RNA was purified from cell cultures using the RNeasy kit (Ambion, Austin, TX) according to manufacturer's instructions. Each RNA sample was reverse transcribed into cDNAs using the "High Capacity Reverse Transcription kit" from Applied Biosystems (Alcobendas, Spain). MMP-11 mRNA expression was quantified using SYBR Green staining and primers 5'-CGATGCTGCTGCTGCTCCAG-3' (forward, 75–97) and 5'-TGGCGTCACATCGCTCCATACCTTTAG-3' (reverse, 448–422) in a 7900HT Fast Real-Time PCR System from Applied Biosystems. The real-time PCR thermal conditions were 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles each at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The relative real-time PCR quantification was based on the $\Delta\Delta C_T$ method using 18S rRNA as reference endogenous gene (specific QuantiTect primer set QT00199367 from Qiagen, Hilden, Germany).

2.5. Luciferase reporter assay

One microgram of DNA was transfected into exponentially growing cells in 24-well plates with Escort IV (Sigma). After 20 h, the medium was replaced by a fresh one containing butyrate or TSA. After 24 h treatment, cells were lysed and luciferase activity was measured in a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold, Germany) using the Luciferase Reporter Gene Assay from Roche (Mannheim, Germany).

For dual luciferase assays, 500 ng of the indicated plasmid was transfected together with 500 ng pRL-TK (Promega, Alcobendas, Spain) into exponentially growing cells in 24-well plates with Escort IV (Sigma). After 20 h, the medium was replaced by a fresh one and further incubated for 24 h. Firefly and *Renilla* luciferase activities present in cellular lysates were assayed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Firefly luciferase data were normalized for the corresponding transfection efficiency by using the *Renilla* luciferase activity of each sample.

Plasmids containing different fragments of the promoter region of *MMP11* (0.1-ST3, 0.45-ST3, 2.5-ST3 and 2.5-ST3- Δ API) [29,30] were cloned into the pGL3-Basic reporter vector (Promega). pGL3-control plasmid (also from Promega) was used as a negative control for butyrate and TSA promoter induction. In addition, we have designed synthetic mutants (Genscript, Piscataway, NJ) from the three Sp1 sites located in the 0.1-ST3 fragment, either individually (M1: –68/–63, M2: –41/–36 and M3: –25/–20), or in combination (M12, M13, M23 and M123) by replacement of the consensus sequence GGGCGG by TTTCTT, and cloned them into the pGL3-Basic vector.

The effect of the specific inhibitors for p38-MAPK (SB203580), JNK-MAPK (SP600125), and ERK1/2-MAPK (PD98059) (all from Sigma) on *MMP11* promoter activity was analyzed after preincubation for 2 h at the indicated concentrations (described in the literature [31] and previously tested in our group with BCS-TC2 cells [24]) and further treatment with butyrate or TSA for 24 h. Incubations with mithramycin A were carried out for 24 h together with butyrate and TSA. MAPK-inhibitors were dissolved in DMSO and mithramycin A in methanol; the corresponding controls contained an equivalent amount of the vehicles. In order to be able to compare directly promoter activity and protein levels, conditioned media obtained in the presence of mithramycin A or ERK1/2 inhibitor were collected from exponentially growing cultures (~50% confluence).

2.6. EMSA

Double stranded oligonucleotides covering different regions of the 0.1-ST3 *MMP11* promoter fragment were end-labeled with [γ -³²P]ATP using T4 polynucleotide kinase. Unincorporated ATP was removed by centrifugation in G-50 spin columns (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Nuclear proteins (5 μ g) were incubated with binding buffer (5% glycerol, 15 mM Tris pH 7.5, 1.5 mM dithiothreitol, 1.5 mM EDTA, 0.5 mM MgCl₂), 2 μ g poly(dI-dC), 20 μ g/ml BSA and the radiolabeled probe for 30 min at room temperature. DNA-protein complex was resolved by electrophoresis in 4% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in 0.5 \times Tris-borate-EDTA (TBE) buffer. The gels were dried and analyzed by autoradiography. Supershift was performed by subsequent incubation of the reaction mixture for 15 min at room temperature with antibodies against Sp1, Sp3, MAZ and ZBP-89. Competition studies were carried out in the presence of 100-fold molar excess unlabeled probes.

2.7. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP procedures were performed according to [24]. Briefly, isolated nuclei from formaldehyde-crosslinked cell cultures were lysed and the crosslinked chromatin was sonicated to yield fragments of around 300 bp. Diluted soluble chromatin fragments were precleared with blocked Protein G Dynabeads (Invitrogen, Barcelona, Spain) to discard non-specifically-bound chromatin fragments. Immunofractionation of complexes was carried out by adding 2 μ g of the corresponding antibodies (anti-Sp1 or anti-Smad2/3) to aliquots containing 50 μ g DNA each. The immunocomplexes were recovered by centrifugation after adding blocked Protein G Dynabeads and extensively washed. An aliquot of the crosslinked chromatin was treated as before, but in the absence of the antibody (n.a. fraction) and the first supernatant, after the immunoprecipitation, was saved as Input fraction. Immunoselected chromatin was eluted and the formaldehyde crosslinking was reverted. The DNA from all samples was purified with a PCR purification kit (Sigma) and used for PCR analysis (38 cycles with a 60 °C annealing temperature) using a specific primer pair [forward: 5'-TGCTAGGAGAGTTCAGAACAAAGG-3' (–100/–76); reverse: 5'-GCGCTCGGAGCCAG-3' (+36/+22)]. PCR fragments were size-fractionated by 2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and analyzed on a Gel Doc XR photodocumentation system from Bio-Rad.

2.8. Protein immunoprecipitation

Immunoprecipitation was carried out by incubation of 50 μ l Protein G Dynabeads with 2.5 μ g antibody against Sp1 or with anti-Smad2/3 for 20 h at 4 °C. After extensive washing of the immunocomplexes with PBS/BSA (BSA 5 mg/ml), the immunofractionation was carried out adding 100 μ g of nuclear proteins and incubating for 2.5 h at 4 °C. Immunoprecipitated material was washed 3 times in PBS/BSA and proteins were eluted from the Dynabeads. Detection was performed by Western blot as described earlier using the primary mouse monoclonal antibodies *pan*-acetyl-lysine, or anti-human p53, or goat polyclonal antibodies anti-human Sp1 or anti-human Smad2/3. Peroxidase-conjugated mouse TrueBlot ULTRA anti-mouse IgG and peroxidase-conjugated goat TrueBlot anti-goat IgG, that avoid the detection of the ~55 kDa heavy and ~23 kDa light chains of the immunoprecipitating antibody, were used as secondary antibodies. No commercial antibodies to our knowledge have been yet raised against human acetyl-Smad2/3; thus, identification of acetylated Smad in the immunoprecipitated materials was based on the electrophoretic mobility of the band as previously described [32].

2.9. FACS analysis

Cells were detached by trypsinization and allowed to recover for 30 min in complete culture medium. After washing twice with PBS, 5×10^5 cells were resuspended in 500 μ l PBS containing 0.1% (w/v) BSA and 0.02% (w/v) azide. Cells were fixed in cold 3.7% formaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. The cell suspension was incubated in the presence of 100 μ l of the appropriate dilution of goat polyclonal antibody anti-human MMP-11 (C-20) for 1 h at 37 °C in the dark. Afterwards, cells were again washed twice with PBS/BSA/azide, and incubated with 100 μ l of the appropriate dilution of FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG monoclonal antibody for 1 h at 37 °C in the dark. Finally, cells were washed twice with PBS/BSA/azide, resuspended in 300 μ l and analyzed in a FACScan (Becton-Dickinson, San José, CA), as described [28].

2.10. Other procedures

The differences between the mean values were analyzed with SigmaPlot v 11.1 (Systat Software, Erkrath, Germany) and using Student's *t*-test (two-tailed). Statistical significance was considered to be achieved at the $p < 0.05$ level.

Prediction of the transcription factors binding sites in the *MMP11* promoter was carried out with MatInspector v7.7.3 using library v8.2, AliBaba 2.1 program and TFSEARCH 1.3.

3. Results

3.1. Expression of MMP-11 in BCS-TC2 cells

The first approach was to verify whether MMP-11 was expressed in human colon adenocarcinoma epithelial cells using as a positive

expression control the human rhabdomyosarcoma RD cells [5]. Western blot analysis of conditioned media from BCS-TC2, Caco-2, HT29 and RD cells is shown in Fig. 1A. The three studied colon adenocarcinoma cells express MMP-11 at different levels. The lowest expression of MMP-11 was observed in HT29 and RD cells in which no active form was detected in the culture media. The highest expression among colon adenocarcinoma cells was found in BCS-TC2 cells. The treatment of RD cells with several classic activators of the MMP-11 expression, such as PMA and all-*trans* and 9-*cis* retinoic acid, revealed a clear increase in the protein levels of the MMP-11 proenzyme (Fig. 1B), as previously described [7].

The effect of the HDAC inhibitors butyrate and TSA on the expression of MMP-11 in BCS-TC2 cells has been analyzed. MMP-11 was detected in all the samples, at least in the proenzyme form (~55 kDa). Treatment for 48 h with 0.5 μ M TSA or 4 mM butyrate increased the level of the active processed form (~44 kDa), whereas the proenzyme was almost unaffected (Fig. 1C, left panel). Densitometric analysis of different blots from three independent experiments revealed that the overall MMP-11 content significantly increases ($p < 0.05$) 1.4-fold after butyrate treatment and 1.7-fold after TSA treatment, using as loading control the expression of MMP-2 that is unaffected by HDAC inhibitors. The ratio between the active and proenzyme forms increased 3.8-fold and 6.5-fold after butyrate or TSA treatments, respectively ($p < 0.01$). Incubation of conditioned media with α 2-macroglobulin specifically removed the lower molecular mass band. This confirms the identification of the 44 kDa band as the active MMP-11 form (Fig. 1C, right panel).

Quantitative RT-PCR assays using mRNA extracted from cells treated 24 h with butyrate or TSA are shown in Fig. 1D. The expression of MMP-11 mRNA was found to increase about 1.5- to 2.0-fold in BCS-TC2 cells treated with TSA or butyrate, respectively ($p < 0.01$).

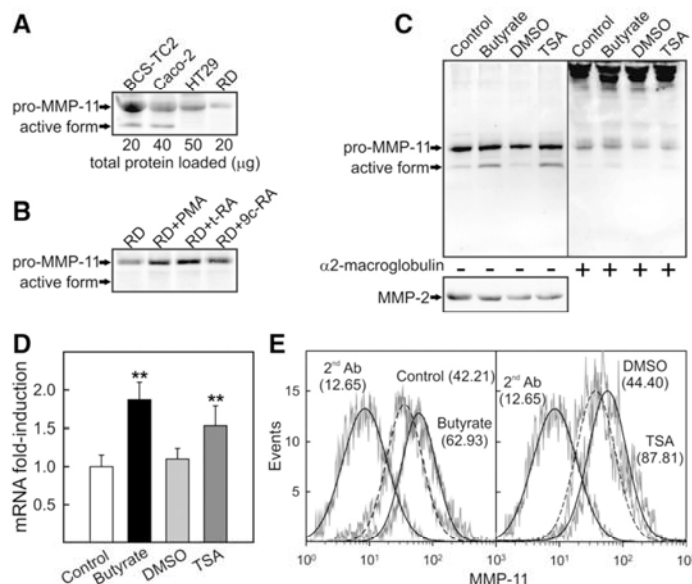


Fig. 1. Expression of MMP-11 in human colon adenocarcinoma and RD cells. Detection of MMP-11 by Western blot in (A) conditioned media from different cells, and (B) conditioned media from RD cells after treatment with PMA and retinoic acid isomers (t-RA and 9c-RA). (C) Western blot of MMP-11 and MMP-2 in conditioned media obtained after treatment of BCS-TC2 cells with 4 mM butyrate and 0.5 μ M TSA for 48 h. Controls for TSA treatment were incubated with the same concentration of DMSO as in treated cells. In the right panel, conditioned media were preincubated for 12 h at 37 °C with 10 μ g α 2-macroglobulin, that forms complexes with active MMP-11. Representative blots from three independent experiments are shown. (D) Quantitative real-time reverse-transcription PCR was carried out after treatment of cells with 4 mM butyrate and 0.5 μ M TSA for 24 h. Data are normalized to 18S rRNA levels as internal control, and a value of 1 is assigned to the corresponding untreated control. Data represent mean values (\pm S.D.) for four different experiments (**, $p < 0.01$). (E) Cellular MMP-11 expression was analyzed by flow cytometry (mean fluorescence intensities between brackets) in permeabilized cells without (dashed lines) or after treatment with 4 mM butyrate or TSA 0.5 μ M for 24 h. Histograms are representative of three different experiments.

MMP-11 was also detected in permeabilized BCS-TC2 cells by flow cytometry (Fig. 1E). Data revealed not only the expression of MMP-11 but also that butyrate and TSA treatments increased the mean fluorescence intensity around 1.5- and 2-fold, respectively.

3.2. Basal activity of MMP11 promoter

Several fragments from the *MMP11* promoter controlling the expression of firefly luciferase together with a control plasmid with a strong promoter controlling the expression of *Renilla* luciferase were transfected into BCS-TC2 cells. Fig. 2A shows a schematic representation of the promoter fragments with the potential binding sites for transcription factors as deduced from the *MMP11* promoter sequence analysis and those described in the literature [5,6,29].

The longest promoter fragment used (2.5-ST3) showed the lowest basal activity values suggesting the presence of distal inhibitory regions (Fig. 2B). In fact, removal of the AP-1 site located at –2419 (2.5-ΔAP1-ST3 fragment) increased around 1.5-fold the promoter activity. The presence of other silencing elements in the region between –2179 and –450 is suggested by the fact that the higher basal activity was achieved with the 0.45-ST3 fragment. Removal of the DR1-RARE containing sequence (0.1-ST3 fragment) did not have any significant effect.

3.3. Effect of butyrate and TSA on MMP11 promoter activity

In order to check if the modification in MMP-11 expression after butyrate or TSA treatments was correlated with changes in the promoter activity, the effect of both agents on the transcriptional activity of *MMP11* promoter fragments was analyzed (Fig. 2C). Butyrate treatment induced 6- to 10-fold increase in the promoter activity of all the analyzed fragments compared to basal levels ($p < 0.01$). Taking into account that even the smaller promoter fragment (0.1-ST3) induces a significant increase in luciferase activity, the existence of butyrate responding elements can be suspected within the proximal promoter region (–110 to +13). TSA treatment also induced an increase in the activity of the promoter, but lower than that observed with butyrate, ranging from around 3-fold for the 0.45-ST3 fragment to around 6-fold with 2.5-ΔAP1-ST3 ($p < 0.01$).

We have also analyzed the effect of butyrate concentration on the luciferase activity of the 0.1-ST3 fragment (Fig. 2D). A dose-dependent increase in activity is observed, reaching saturation at 4 mM confirming that this concentration is optimal to observe transcriptional effects of this HDAC inhibitor as we have previously reported [24].

3.4. Binding of transcription factors to the basal MMP11 promoter

Taking into account that the 0.1-ST3 promoter fragment shows a high basal luciferase activity and a clear response to butyrate, the

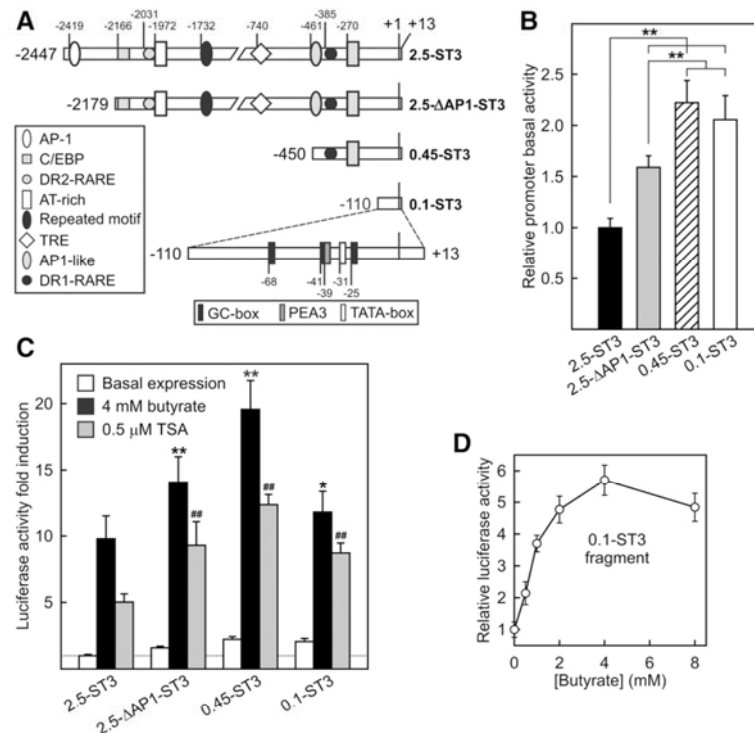


Fig. 2. Basal *MMP11* promoter activities and effects of butyrate and TSA treatments. (A) Scheme of the different *MMP11* promoter fragments employed in luciferase assays showing the binding sites for transcription factors relative to the transcription start position (+1) (AP-1, activator protein-1; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; DR-RARE, direct repeat-retinoic acid responsive element; TRE, thyroid hormone response element; PEA-3, polyoma enhancer A binding protein-3). (B) Basal promoter activity of the different *MMP11* promoter constructs in BCS-TC2 cells measured with dual luciferase assays in exponentially growing cells. Data is expressed in arbitrary units with a value of 1 for the 2.5-ST3 construct (**, $p < 0.01$). (C) Effect of butyrate or TSA treatment (24 h) on the luciferase activities of *MMP11* promoter fragments referred to the basal activity of the 2.5-ST3 construct (dotted line) ($p < 0.01$ in all comparison between butyrate or TSA treatments and their respective controls; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ butyrate treatment in cells transfected with the different constructs compared to the 2.5-ST3 construct; **, $p < 0.01$ idem for TSA treatments). (D) Concentration-dependent effect of butyrate treatment for 24 h on the luciferase activity of the 0.1-ST3 construct. Data are expressed as fold-induction referred to untreated cells, and correspond to mean values (\pm S.D.) of three independent experiments with triplicate samples.

binding of transcription factors to this promoter region was studied. Using several prediction programs we have detected potential binding sites for transcription factors previously related with the response to butyrate in other genes, such as MAZ, ZBP-89 and Sp1/Sp3. Accordingly, we designed several oligonucleotides for EMSA and supershift assays that covered the complete sequence of the 0.1-ST3 fragment containing differential transcription binding sites (Fig. 3A).

EMSA with nuclear extracts obtained after treatment with butyrate and TSA were carried out to check if they were able to modify the position or intensity of some of the bands. Supplementary Fig. 1A shows several bands whose intensity remained mainly unaltered after the treatments with the four different 0.1-ST3 probes. Competition assays (Supplementary Fig. 1B) confirmed that the upper band (marked with an arrow) was specifically competed out with an

excess cold probe but not affected by an unrelated cold probe. Taking into account that HDAC inhibitors were unable to modify the EMSA profiles, we first checked the expression of these factors in nuclear extracts and then analyzed by supershift assays their potential binding to sequences included in the 0.1-ST3 probes.

The expression of Sp1, Sp3, ZBP-89, MAZ and of a binding partner of Sp1, Smad2/3, was verified by Western blot analyses of nuclear extracts from untreated and HDAC inhibitor-treated BCS-TC2 cells (Fig. 3B). Lamin B1 levels were used as control of protein loading. Expression of Sp1 was not significantly modified by butyrate or TSA treatments, even at high butyrate concentrations (Fig. 3C). Regarding Sp3, three clearly differentiated bands were observed, one of 100 kDa and two of approximately 60 kDa. Butyrate and TSA treatments increased the level of the 100 kDa isoform that corresponds with the

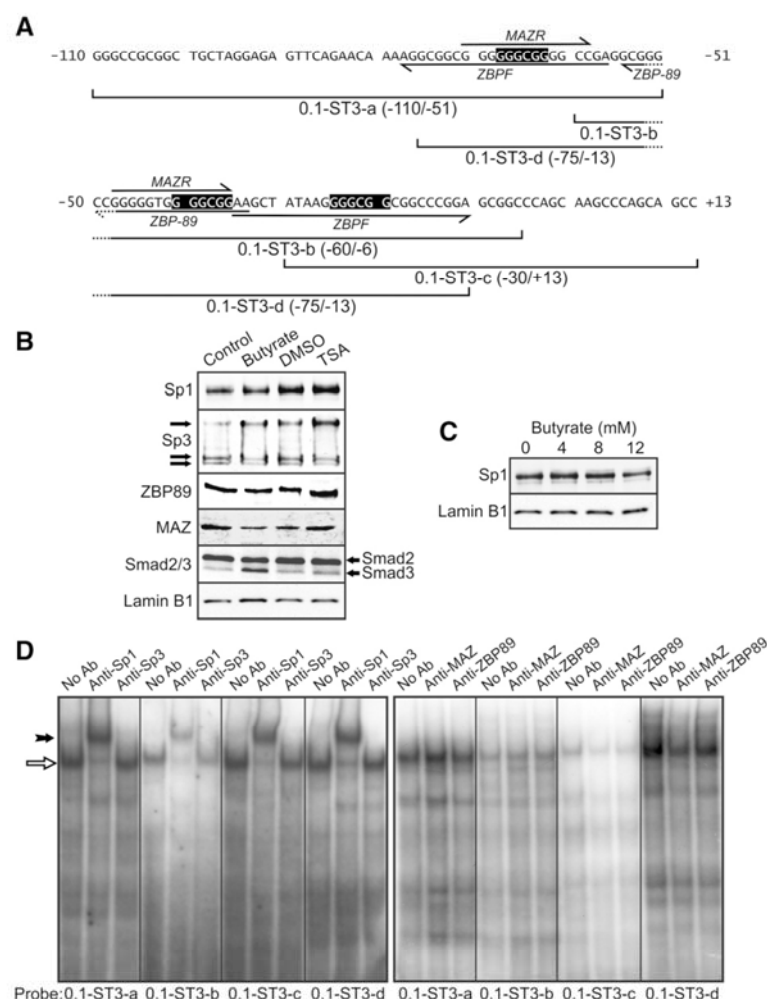


Fig. 3. Expression of transcription factors in BCS-TC2 cells and supershift assays in the 0.1-ST3 region of the *MMP11* promoter. (A) Sequences of the 0.1-ST3 promoter fragment and of the different probes designed for the EMSAs. A computational prediction of the potential transcription factors binding sites is shown (MAZR, myc-associated zinc finger protein related; ZBPF, Zinc binding protein factor; ZBP-89, zinc finger binding protein-89; Sp1/Sp3 binding sites are reverse shaded). (B) Western blot analysis of Sp1, Sp3, ZBP-89, MAZ and Smad2/3 were carried out using nuclear extracts from BCS-TC2 cells treated with 4 mM butyrate or 0.5 μ M TSA for 24 h. (C) Sp1 expression in dependence of butyrate concentration. Blots using anti-lamin B1 were used as loading controls. Representative blots from three independent experiments are shown in B and C. (D) Supershift assays using the probes described in (A) and specific antibodies against: (left panel) Sp1 and Sp3, and (right panel) MAZ and ZBP-89. Interaction with the Sp1 antibody resulted in a significant decrease in the specific shift band (white arrow) and in the appearance of a new supershifted band (black arrow). The other antibodies did not induce band supershift. Gels are representative of at least three independent experiments.

Sp3 active form, while the 60 kDa isoforms (generated by mRNA internal translation) remained unaffected. ZBP-89 expression was mainly unaffected whereas MAZ decreased with butyrate treatment and slightly increased with TSA. In addition, Smad2/3 expression was analyzed in nuclear extracts; Smad2 (lower mobility band) showed a higher expression than Smad3 (higher mobility band). Whereas almost no variations were detected in Smad2 expression with butyrate and TSA, an upregulation of Smad3 was observed mainly with butyrate treatment (Fig. 3B). Regarding supershift assays, Sp1 antibodies, but not those against Sp3, the other closely related member this family of transcription factors, were able to decrease the mobility of the specific EMSA band (black arrow in Fig. 3D, left panel). On the other hand, MAZ and ZBP-89 antibodies were not able to alter the mobility of any band (Fig. 3D, right panel).

3.5. Binding of Sp1/Smad complexes to the MMP11 promoter

In order to identify the presence of other transcription factors bound to Sp1 we carried out immunoprecipitation assays using anti-Sp1 antibodies. Immunoprecipitated material was analyzed by Western blot using anti-Sp1 antibodies (Fig. 4A, left panels); as expected, blots yielded a strong band around 100 kDa corresponding to Sp1. In a first approach, and taking into account that butyrate and TSA are HDAC inhibitors, we used *pan*-acetyl-Lys antibody to develop blots and only a major band around 50 kDa was detected. We tried to identify this acetylated protein among previously described Sp1 partners. On a first step, we checked up the presence of acetylated-p53 that has been described associated with Sp1 in multiprotein complexes that regulate the transcriptional activity of specific genes [33], but blots were negative (data not shown). On the other hand, Western blot analysis revealed that Smad2 (band of ~50 kDa) co-immunoprecipitated with Sp1 in nuclear extracts of BCS-TC2 cells. Immunoprecipitation with anti-Smad2/3 antibodies confirmed the complex between Sp1 and Smad2 (Fig. 4A, right panels).

Butyrate and TSA treatments increased the levels of Sp1/Smad2 complexes and, additionally, there was a clear induction in the acetylation state [32] of Sp1-bound Smad2 after butyrate and TSA treatment. To further confirm the binding of Sp1/Smad2 complex to the

MMP11 promoter, we performed ChIP assays using specific antibodies for Sp1 and Smad2/3. Chromatin immunoprecipitation confirmed not only Sp1 binding (previously observed by supershift assays, Fig. 3D, left panel) but also showed Smad binding to the MMP11 promoter. Butyrate treatment slightly decreased Sp1 binding (~1.4-fold lower) but significantly enhanced the interaction of Smad with the promoter (~2-fold; Fig. 4B, – Mit A). The binding of Sp1 is specific, as mithramycin A (an antibiotic that is able to bind to GC-rich sequences in several promoters thus interfering with the binding of Sp1 to these sites [34]) impeded the binding of this transcription factor either in the absence or presence of butyrate (Fig. 4B, lower panel, + Mit A). However, in the presence of mithramycin A, Smad is still bound to the promoter region although binding of Sp1 is abolished. After butyrate treatment, Smad is no longer attached to this region of the MMP11 promoter (Fig. 4B, + Mit A).

3.6. Inhibition of Sp1 binding to the MMP11 promoter

To confirm the role of Sp1 in the activation of the MMP11 promoter, both in basal conditions and after butyrate or TSA treatment, luciferase assays in the presence of mithramycin A were performed. Mithramycin A treatment significantly reduces MMP11 promoter activity in BCS-TC2 cells. Under basal conditions, transcriptional activity of the 2.5-ST3 (Fig. 5A) and 0.1-ST3 (Fig. 5B) fragments was reduced around 40% and 15%, respectively. Promoter activation induced by butyrate was significantly reduced by mithramycin A (around 40–50% decrease in both promoter fragments), being this reduction lower with TSA (around 25%).

Additionally, the effect of mithramycin A on the MMP-11 levels in conditioned media from exponentially growing cells was analyzed by Western blot (Fig. 5C). Under these conditions, butyrate induced a higher increase in the overall MMP-11 levels (3.5-fold) than that observed in subconfluent cultures (1.4-fold; Fig. 1C) without significant modifications in the behavior with TSA. Mithramycin A reduced the increase in MMP-11 expression induced by butyrate (from 3.5 down to 2-fold increase), this effect being more evident in the pro-MMP-11 form than in the active one. Mithramycin A effects were less marked in the TSA treatment.

To further confirm the essential role of Sp1 in the basal expression of MMP11 as well as in the induction by HDAC inhibitors, mutations of the individual Sp1 sites in the 0.1-ST3 fragment and combinations of these mutations were cloned into pGL3-Basic vector. Luciferase assays in the absence (Fig. 6A) and in the presence of butyrate (Fig. 6B) or TSA (Fig. 6C) were carried out with the wild-type fragment and the seven different mutant constructs. Basal expression was reduced around 50% when either M1 or M2 were analyzed, and was almost completely abolished when the M12 or the M123 constructs were considered. On the other hand, mutation of the –25/–20 Sp1 did not significantly alter luciferase activity compared to the wild-type fragment. Regarding the effect of butyrate and TSA, the –68/–63 Sp1 site seems to be the main HDAC-inhibitor response element as its mutation reduces by 80% or 65% the transcriptional induction after butyrate or TSA treatments, respectively, when luciferase activities are referred to that of the wild-type basal activity. Mutation of the –41/–36 Sp1 site reduces by around 50% the transcriptional activation induced by both treatments, being equivalent to the decrease observed in basal activity with this mutation. Again, a cooperative effect was observed by combination of the –68/–63 mutation with the other two sites. No significant effect was observed by mutation of the –25/–20 site alone. Supplementary Fig. 2 represents these same data but the luciferase activity fold-induction after HDAC inhibitor treatments is referred to the basal activity of the corresponding mutant instead of that of the wild-type. In this way, it can be better observed that only the mutation of the –68/–63 Sp1 site (or its combination with the other two mutations) affects the transcriptional activation after butyrate or TSA treatments.

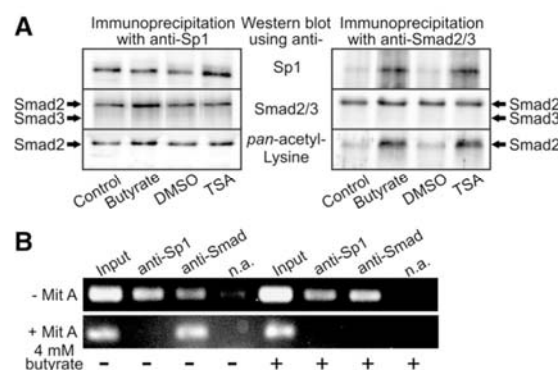


Fig. 4. Interactions between Sp1 and Smad in the MMP11 promoter. (A) Immunoprecipitated material with antibodies against Sp1 or Smad2/3 from nuclear extracts of BCS-TC2 cells treated with 4 mM butyrate or 0.5 μ M TSA for 24 h were probed for the presence of Sp1, Smad2/3 and *pan*-acetyl-Lys by Western blot analysis with the corresponding antibodies. (B) ChIP assays were performed to confirm the binding of Sp1 and Smad transcription factors to the MMP11 promoter in cells without butyrate (–) or after a 24 h treatment with butyrate (+), and in the absence (– Mit A) or presence (+ Mit A) of mithramycin A. The immunoprecipitated samples using antibodies against Sp1 and Smad were analyzed by PCR using the primers described in Materials and Methods. As controls for the ChIP experiment, PCR was also carried out with the supernatant of a mock immunoprecipitation without antibodies (Input; diluted 1:100) and with samples obtained under these no-antibody (n.a.) conditions.

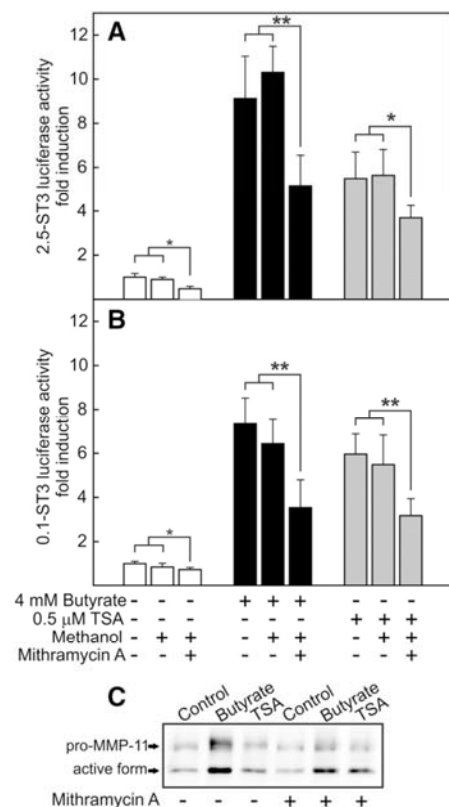


Fig. 5. Role of Sp1 in butyrate and TSA activation of the *MMP11* promoter and protein expression. Luciferase activity was measured in BCS-TC2 cell homogenates obtained after transfection with (A) the 2.5-ST3 or (B) the 0.1-ST3 promoter fragments, and further treatment for 24 h with butyrate or TSA in the presence or absence of 200 nM mithramycin A. All the samples contained the same concentration of DMSO. Data correspond to mean values (\pm S.D.) from three independent experiments with triplicate samples (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). (C) Western blot detection of MMP-11 in conditioned media from BCS-TC2 cells after treatment with butyrate or TSA in the absence or presence of mithramycin A (all the samples contain the same concentration of DMSO and methanol). A representative blot of three independent experiments is shown.

3.7. Involvement of MAPKs in *MMP11* promoter induction

To gain further insight into the mechanisms involved in the induction of the transcriptional activity of *MMP11* promoter (2.5-ST3 construct) by butyrate and TSA, luciferase assays were performed in the presence of specific inhibitors of the main members of the MAPK family. Inhibitors of p38-MAPK and JNK (SB203580 and SP600125, respectively) did not modify the activation of the *MMP11* promoter by butyrate or TSA (Fig. 7). However, the effect of butyrate and TSA was significantly reduced in the presence of the specific ERK1/2 inhibitor PD98059 (Fig. 7). This effect is dose-dependent and abolishes butyrate- and TSA-induced activation at 50 μ M (Fig. 8A). Luciferase assays were also carried out with the 0.1-ST3 construct in the presence of PD98059 (Fig. 8B). The effect of butyrate and TSA was also significantly reduced in a dose-dependent manner, although the transcriptional activation by these HDACs inhibitors was not completely suppressed even at the highest concentration of PD98059 used. Basal transcriptional activity was not significantly affected by the ERK1/2 inhibitor in cells transfected either with the 2.5-ST3 or the 0.1-ST3 promoter fragments.

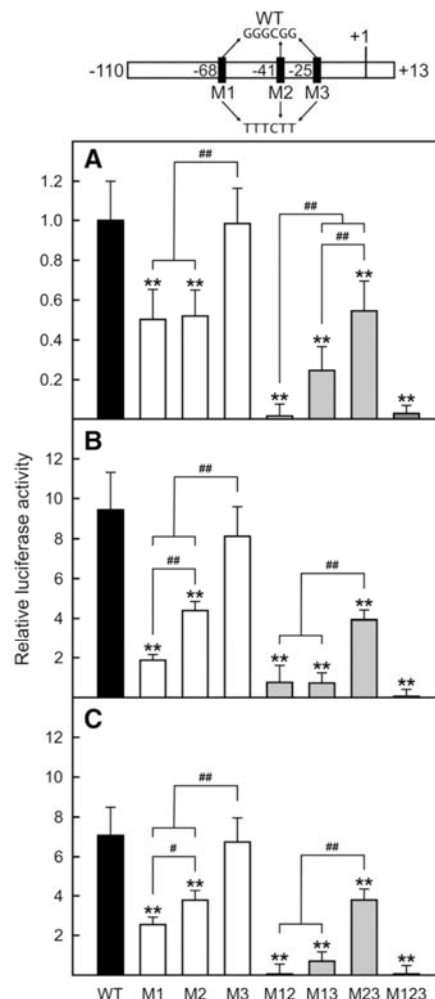


Fig. 6. Luciferase activity of pGL3-Basic constructs containing the wild-type 0.1-ST3 promoter fragment or mutations of the Sp1 consensus sequences. Luciferase activity was measured in BCS-TC2 cell homogenates obtained after transfection with the 0.1-ST3 wild-type (WT) or mutant constructs. A scheme of the position of the different mutations is shown in the upper part of the figure. After transfection, cells were further incubated for 24 h in the absence (A, basal activity) or presence of 4 mM butyrate (B) or 0.5 μ M TSA (C). Activity is expressed as fold induction referred to the activity of untreated cells transfected with the wild-type construct. Data correspond to mean values (\pm S.D.) from three independent experiments with triplicate samples. Mutations were obtained by replacement of the Sp1 consensus sequences GGGCGG by TTTCTT: M1: -68/-63; M2: -41/-36; M3: -25/-20; M12: mutations M1 and M2; M13: mutations M1 and M3; M23: mutations M2 and M3; M123: mutations M1, M2 and M3. (*, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ for comparisons between mutant constructs vs. wild-type; #, $p < 0.05$ and ##, $p < 0.01$ for comparisons between mutant constructs with the same number of mutations).

Finally, the effect of PD98059 on the MMP-11 protein levels was analyzed by Western blot of conditioned media from exponentially growing cells (Fig. 8C). Inhibition of ERK1/2 pathway significantly reduced the increase in protein levels induced by butyrate treatment (from 3.5-fold down to 1.9-fold), being this effect higher for the proenzyme levels. Inhibition of ERK1/2 in TSA-treated cells induced a decrease in the proenzyme levels without affecting the overall expression of MMP-11. All these results suggest that ERK1/2 signaling

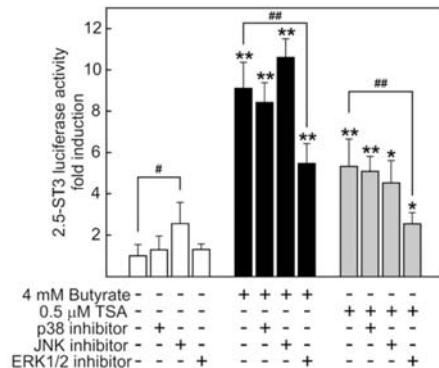


Fig. 7. Involvement of MAP-kinases in butyrate and TSA activation of the *MMP11* promoter. Luciferase activity was measured in BCS-TC2 cell homogenates obtained after transfection with the 2.5-ST3 construct and treatment for 24 h with butyrate or TSA in the presence or absence of 25 μM SB203580 (p38-MAPK inhibitor), 10 μM SP600125 (JNK inhibitor), or 10 μM PD98059 (ERK1/2 inhibitor). Activity is expressed as fold induction referred to the activity of butyrate-untreated transfected cells. Data correspond to mean values (\pm S.D.) from four independent experiments with triplicate samples (*, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ comparisons vs. controls without butyrate or TSA; #, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ comparisons vs. corresponding group without MAPK inhibitors).

pathway is important in the transcriptional regulation of the *MMP11* promoter.

4. Discussion

MMP-11 expression has been normally associated with stromal fibroblasts surrounding aggressive tumors although it has also been detected in murine macrophages and Hca-F mouse hepatocarcinoma cells [8–13,15,35]. The expression of MMP-11 in non-stromal cells was firstly observed by immunohistochemistry in a group of aggressive primary mammary carcinomas (metaplastic carcinomas), whose cells had undergone a degree of epithelial-to-mesenchymal transition with mesenchymal attributes as spindle/fusiform shape and vimentin expression [15]. Regarding the expression of MMP-11 in colonic tumors, this protein has only been found in the stroma surrounding the tumor [11,35], but now we have detected its expression in three different human colon adenocarcinoma cell lines (BCS-TC2, HT-29 and Caco-2) from epithelial origin. To validate our detection system, we have verified the well-studied expression of MMP-11 in conditioned media from the rhabdomyosarcoma cell line RD in control conditions and after induction with phorbol esters or retinoic acid [7,30].

Although there is an extensive knowledge on the regulatory *cis*-elements and corresponding *trans*-activators involved in the transcriptional regulation of several members of the MMP family, scarce information can be found regarding human *MMP11* [6,29]. The *MMP11* promoter contains several regulatory elements not common to other members of this family, or that strongly differ in their promoter activity regulation [29]. Thus, while the expression of others MMP genes is repressed by retinoic acid, it activates *MMP11* expression through a DR1-RARE sequence located in its proximal promoter [7]. *MMP11* gene is also characterized by the absence of an AP-1 binding site in its proximal promoter, common to other members of the MMP family, although other AP-1 sites are located in distal regions of its promoter.

To gain insight into the *MMP11* transcriptional regulation we have analyzed different constructs from its promoter. Several inhibitory elements are located in distal regions, as the lower activity levels are achieved with the longest promoter fragment used. One of these inhibitory elements corresponds to an AP-1 site, since its deletion

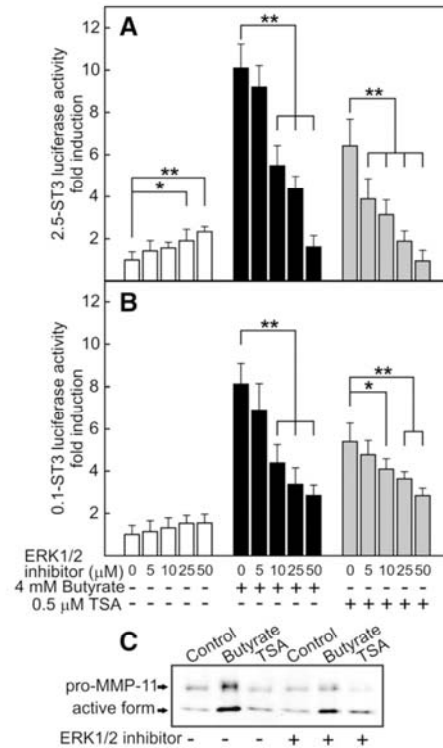


Fig. 8. Involvement of ERK1/2-MAPK in butyrate and TSA activation of the *MMP11* promoter and protein expression. Luciferase activity was measured in BCS-TC2 cell homogenates obtained after transfection with (A) the 2.5-ST3 or (B) the 0.1-ST3 constructs, and further treatment for 24 h with butyrate or TSA in the presence or absence of different concentrations of the PD98059 ERK1/2 inhibitor. Activity is expressed as fold induction referred to the activity of butyrate-untreated transfected cells. Data correspond to mean values (\pm S.D.) from three independent experiments with triplicate samples (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). (C) Western blot detection of MMP-11 in conditioned media from BCS-TC2 cells after treatment with butyrate or TSA in the absence or presence of 10 μM ERK1/2 inhibitor. A representative blot of three independent experiments is shown. All the samples contained the same concentration of DMSO.

(2.5ΔAPI-ST3 construct) is correlated with an increased transcriptional activity. The data obtained show that the main regulatory region within this promoter is located between -110/+15 bp of the gene relative to the transcription start site.

We have first described the transcriptional regulation of *MMP11* and the protein expression through Sp1 in BCS-TC2 cells. The presence of several GC-boxes (potential Sp1 binding sites) in the proximal regions of the *MMP11* promoter has been reported [29]. In addition, two indirect observations point out a potential role of Sp1 in *MMP11* transcription: i) the coexpression of Sp1 and MMP-11 proteins in gastric tumors [14], and ii) a decrease in the TGF-β-induced upregulation of *MMP11* after mithramycin A treatment in pancreatic cells observed in gene expression profiling experiments [36]. However, there are neither data about the biological meaning of these correlations nor a direct demonstration of the binding of Sp1 to the GC-rich sequences. Here we have shown that Sp1 binds to the *MMP11* promoter through the proximal GC-boxes. Mithramycin A interferes with Sp1 binding [34] and confirms that Sp1 regulates the basal transcriptional activity of the *MMP11*. Interestingly, Sp1 has also been described as an important factor regulating the transcriptional activity of other MMP genes, such as *MMP2* and *MMP14*, in which Sp1 also binds to proximal GC-boxes, and *MMP9* where Sp1 binds to distal ones [37–39].

Although little is known regarding the epigenetic control of the expression of *MMP* genes, several reports support a general role of transcription factors in this control by recruiting chromatin-remodeling factors to promoters (for review see [6]). Besides the regulation of the acetylation status of histones by histone acetyltransferases (HATs) and HDACs, there is increasing evidence of non-histone proteins involved in transcription that are acetylated at lysine residues modifying their activity or their binding affinity to promoters [40]. Thus, the acetylation status of both histones and transcription factors may play an important role in the transcriptional regulation of *MMP* genes [26]. Treatment of cells with HDAC inhibitors results in the down- or up-regulation of gene expression of only a small percentage of genes as we have previously reported in BCS-TC2 cells after butyrate treatment [22].

On this idea, we have studied the effect of butyrate and TSA on the transcriptional activity of the *MMP11* promoter and the involvement of Sp1/Smad complexes in its regulation in BCS-TC2 cells. We have confirmed the activation by butyrate and TSA of the *MMP11* promoter with all the fragments employed, even with the shortest one (0.1–ST3), being this effect stronger with butyrate. RT-PCR analysis clearly demonstrates a significant increase in *MMP-11* mRNA levels after the treatments, which is correlated with an increase in secreted protein levels mainly from the active/mature form. This is in good agreement with the described intracellular processing by furin-like serine proteases, which may also act as molecular chaperones facilitating the secretion of the mature form [41]. In any case, the zymogen is also detected in conditioned media as intracellular activation is not complete and the inactive form can also be secreted [42]. Pro-*MMP-11* can be activated extracellularly by other proteases, as urokinase, plasmin, other MMPs as *MMP-3* or even autocatalytically processed [43]. As butyrate has been described to increase the levels of some of these proteases [44,45], this could explain why the highest increase in the expression of *MMP-11* is observed in the active form. Very little is known regarding the effect of butyrate on the expression of other MMPs in colon carcinoma cells. In fact, contradictory findings have been reported using different cell lines; butyrate induces *MMP-9* expression without affecting *MMP-2* in SW1116 cells [46], while it abolishes the expression of *MMP-2* and *–9* in other colon carcinoma cell lines [47].

Taking into account that butyrate is normally associated with beneficial effects in colon carcinogenesis, the induction of *MMP-11* expression by this agent could seem paradoxical as its overexpression has been usually correlated with bad prognosis. A possible hypothesis is that BCS-TC2 cells may trigger a pro-survival response against the pro-apoptotic effects of butyrate by increasing the expression of *MMP-11* among other factors. On this idea, it has been described that the hemopexin domain of some MMPs may induce survival signals via interaction with membrane receptors [48]. On the other hand, *MMP-11* has been shown to be involved in pro-apoptotic processes during development and tissue remodeling processes, which would be in agreement with the beneficial effect of butyrate in colorectal carcinogenesis. In addition, recent work on several MMPs has shown that expression of some MMP family members actually provides a protective and anti-tumorigenic role [49,50], which could be in good agreement with the induction of *MMP-11* by butyrate in BCS-TC2 cells. In any case, further research is required to better understand the physiopathological role of this MMP in colon carcinoma cells.

The *in silico* prediction of potential binding sites for transcription factors showed the presence of binding sequences for MAZ, ZBP-89 and Sp1/Sp3, that have been reported to be involved in the response to butyrate in other genes. However, supershift assays revealed that only Sp1 was able to bind to the region of the *MMP11* promoter that corresponds with the 0.1–ST3 fragment. This binding was further confirmed in the cells by ChIP. Moreover, we have confirmed that two of the three Sp1 sites located within the 0.1–ST3 promoter fragment

(–68/–63 and –41/–36) seem to be essential for basal expression of this gene as deduced from the luciferase activity of mutant constructs in which individual Sp1 sites, or both simultaneously, were replaced by a non-consensus Sp1-binding sequence.

Butyrate or TSA treatments did not alter nuclear Sp1 protein levels, as revealed by Western blot, and its binding affinity to the *MMP11* promoter was not significantly modified according to EMSA, and only showed a slight decrease after butyrate treatment in ChIP (in agreement with a previous report indicating that acetylation of Sp1 may partially reduce Sp1 binding [51]). Previous works have described the Sp1-dependent transcriptional activation of several genes after treatment with HDAC inhibitors without significant changes in the Sp1 protein levels or in its binding affinity to DNA [52,53]. Thus, the effect of these HDAC inhibitors may result from the post-translational modification of Sp1 or some of its transcription factor partners. In any case, here we have confirmed the relevance of Sp1 binding for the transcriptional-enhancement of the *MMP11* promoter by HDAC inhibitors by luciferase assays with mutant constructs lacking the Sp1 consensus sequences. Although basal expression was strongly dependent on both –68/–63 and –41/–36 sites, activation by butyrate or TSA seems to rely more in the former, as its mutation induces a highly significant decrease in *MMP11* transcriptional activation by butyrate and TSA, that is almost completely abolished when this mutation is combined with that of the other Sp1 sites.

Taking these premises into account, we evaluated the acetylation status of nuclear Sp1 immunoprecipitates after the different treatments. No acetylation of Sp1 was observed and only a band around 50 kDa was found acetylated that did not correspond to p53. Other transcription factors, as some members of the Smad family of proteins, have been described as partners of Sp1 [54]. We have verified the presence of Smad2 in the Sp1 immunoprecipitates as well as a slight increase in Sp1/Smad2 complex after butyrate treatment. The formation of this complex was further confirmed by immunoprecipitation with anti-Smad2/3 antibody. Smad2 levels were quite similar between controls and treated cells, as occurs in the nuclear extracts, but there was a significant increase in the amount of Sp1 bound to Smad2 after treatment with the HDAC inhibitors. This increase directly correlated with a rise in the intensity of the band positive for pan-acetyl-Lys antibody with identical mobility to Smad2. It is also worth mentioning that no Smad3 was detected in the immunoprecipitate even though after butyrate treatment there was an upregulation of this protein.

Binding of Smad to the proximal promoter region was verified by ChIP. After butyrate treatment Smad increased its binding affinity to this region of the promoter. Taking into account that no consensus Smad binding elements are present in the analyzed promoter region, Smad could bind through Sp1. However, when ChIP analysis was carried out in the presence of mithramycin A, Smad was still detected bound to this promoter region whereas Sp1 binding was completely abrogated. Thus, either Smad binds directly with low affinity to non-consensus sequences within this region of the promoter, or it could be recruited through an alternative partner or to the basal transcriptional complex. Interestingly, when butyrate treatment was carried out in the presence of mithramycin A, neither Sp1 nor Smad were found bound to the proximal promoter. As butyrate treatment increases the Smad acetylation status, this may contribute to the disappearance of the unspecific direct or indirect interaction with the proximal promoter as it increases the affinity for Sp1 (unbound to the promoter due to mithramycin).

Smad acetylation has been reported to increase its transactivation activity and binding to DNA. Smad2 can be acetylated by p300, CBP, and P/CAF [55], but its acetylation status depends on the equilibrium between acetylation and deacetylation by HDACs. Thus, butyrate or TSA treatments increase the acetylation status of Smad2 fostering its association with Sp1; this may explain the lack of binding of Smad to the *MMP11* proximal promoter in the presence of mithramycin A

after butyrate treatment, as Smad2 will be mainly forming an hetero-complex with Sp1 which is blocked from binding to the promoter. The increased acetylation of Smad2 and its association with Sp1 may explain, at least partially, the increased transcriptional activity of *MMP11* promoter detected after both HDAC inhibitor treatments. Alternatively, butyrate and TSA may inhibit HDACs bound to Sp1 or Smad. This fact could lead to chromatin relaxation by induction of an increased acetylation status of histones in the *MMP11* gene promoter, facilitating in this way its transcription. A similar mechanism has been reported for the induction of the TGF- β receptor I gene after SAHA treatment (other HDAC inhibitor) [56].

Apart from the direct regulation of the activity of transcription factors through acetylation, HDAC inhibitors can regulate different MAPK signaling pathways [24,57]. We have previously reported that butyrate is able to enhance the expression of annexin A1 in BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells by modulation p38-MAPK activity [24]. In addition, it has been reported that MMPs can be upregulated by different agents that activate MAPK pathways, especially through the activation of ERK pathway [58]. Moreover, it has been reported that ERK phosphorylation is enhanced in colon cancer cells after butyrate treatment, and that Sp1 and Smads can be phosphorylated by activated ERK [57]. Thus, we checked whether upregulation of *MMP11* gene by butyrate or TSA was dependent on MAPK pathways.

We have shown that ERK pathway is essential for the upregulation of *MMP11* by both HDAC inhibitors. PD98059, a specific ERK activation inhibitor, induces a dose-dependent decrease in the activation of the transcriptional activity of the long (2.5-ST3) and short (0.1-ST3) promoter fragments without affecting basal transcriptional activity. The effect of the inhibitor of the ERK1/2 pathway can also be observed at the protein level. Unfortunately, we have not been able to detect Sp1 and Smad phosphorylated states using different commercially available antibodies and, thus, we cannot establish whether ERK activity is directed against these targets or against other components of the transcriptional machinery. The nuclear import of Smad2 requires its phosphorylation, but we have not observed variations in the nuclear level of Smad2 after treatments. Thus, Smad2 phosphorylation does not seem to be important for the induction of *MMP11* after HDAC inhibitors treatment.

5. Conclusions

In summary, we have detected for the first time the expression of MMP-11 in epithelial human colon adenocarcinoma cells. In BCS-TC2 cells, Sp1 binding to the GC-rich region in the proximal promoter of *MMP11* is necessary for transcriptional activity through a protein heterocomplex that involves Smad2. Our results show a dual mechanism of transcriptional control of *MMP11* gene upon treatment with HDAC inhibitors. First, butyrate and TSA directly increase the acetylation status of Smad2 favoring the association Sp1/Smad2 with a subsequent increase in the transcriptional activity and MMP-11 protein level. Second, whereas the activation of the ERK signaling pathway is not required for MMP-11 basal expression, it is quite important for the upregulation of the expression of this gene by HDAC inhibitors.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.bbamer.2011.12.010

Acknowledgements

This work was supported by grants BFU2005-02671 and BFU2008-04758 from the DGI, Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) and by grant PR34/07-15866 from Santander/Complutense (Spain). We would like to thank Ricardo Ramos (Unidad de Genómica, Parque Científico de Madrid) for his assistance with quantitative real-time PCR. We are thankful to the staff from the Microscopy and Flow

Cytometry Center from the Complutense University of Madrid for their skillful assistance.

References

- [1] A.R. Folgueras, A.M. Pendas, L.M. Sánchez, C. López-Otín, Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies, *Int. J. Dev. Biol.* 48 (2004) 411–424.
- [2] H. Nagase, R. Visse, G. Murphy, Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs, *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 562–573.
- [3] M.D. Sternlicht, Z. Werb, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001) 463–516.
- [4] E.R. Motrescu, S. Blaise, N. Etique, N. Messaddeq, M.P. Chenard, I. Stoll, C. Tomasetto, M.C. Rio, Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions, *Oncogene* 27 (2008) 6347–6355.
- [5] D. Luo, B. Mari, I. Stoll, P. Anglard, Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25527–25536.
- [6] C. Yan, D.D. Boyd, Regulation of matrix metalloproteinase gene expression, *J. Cell. Physiol.* 211 (2007) 19–26.
- [7] E. Guérin, M.G. Ludwig, P. Basset, P. Anglard, Stromelysin-3 induction and interstitial collagenase repression by retinoic acid. Therapeutic implication of receptor-selective retinoids dissociating transactivation and AP-1-mediated transrepression, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 11088–11095.
- [8] P. Basset, J.P. Bellocq, C. Wolf, I. Stoll, P. Hutin, J.M. Limacher, O.L. Podhajcer, M.P. Chenard, M.C. Rio, P. Chambon, A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas, *Nature* 348 (1990) 699–704.
- [9] T.J. Delebecq, H. Porte, F. Zerimech, M.C. Copin, V. Gouyer, E. Dacquembron, M. Baldyck, A. Wurtz, G. Huet, Overexpression level of stromelysin 3 is related to the lymph node involvement in non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1086–1092.
- [10] I.C. Anderson, D.J. Sugarbaker, R.K. Ganju, D.G. Tsarwhas, W.G. Richards, M. Sunday, L. Kobzik, M.A. Shipp, Stromelysin-3 is overexpressed by stromal elements in primary non-small cell lung cancers and regulated by retinoic acid in pulmonary fibroblasts, *Cancer Res.* 55 (1995) 4120–4126.
- [11] L.D. Johnson, D.M. Hunt, K. Kim, M. Nachtigal, Amplification of stromelysin-3 transcripts from carcinomas of the colon, *Hum. Pathol.* 27 (1996) 964–968.
- [12] C. Odaka, S. Izumiya, Expression of stromelysin-3 (matrix metalloproteinase-11) in macrophages of murine thymus following thymocyte apoptosis, *Cell. Immunol.* 235 (2005) 21–28.
- [13] L. Jia, S. Wang, J. Cao, H. Zhou, W. Wei, J. Zhang, siRNA targeted against matrix metalloproteinase 11 inhibits the metastatic capability of murine hepatocarcinoma cell Hca-F to lymph nodes, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 2049–2062.
- [14] Y.H. Yang, H. Deng, W.M. Li, Q.Y. Zhang, X.T. Hu, B. Xiao, H.H. Zhu, P.L. Geng, Y.Y. Lu, Identification of matrix metalloproteinase 11 as a predictive tumor marker in serum based on gene expression profiling, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 74–81.
- [15] A. Ahmad, A. Hanby, E. Dublin, R. Poulosom, P. Smith, D. Barnes, R. Rubens, P. Anglard, I. Hart, Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression, *Am. J. Pathol.* 152 (1998) 721–728.
- [16] A. Noel, A. Boulay, F. Kebers, R. Kannan, A. Hajitou, C.M. Calberg-Bacq, P. Basset, M.C. Rio, J.M. Foidart, Demonstration in vivo that stromelysin-3 functions through its proteolytic activity, *Oncogene* 19 (2000) 1605–1612.
- [17] B.P. Mari, I.C. Anderson, S.E. Mari, Y. Ning, Y. Lutz, L. Kobzik, M.A. Shipp, Stromelysin-3 is induced in tumor/stroma cocultures and inactivated via a tumor-specific and basic fibroblast growth factor-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 618–626.
- [18] A.C. Noel, O. Lefebvre, E. Maquoi, L. VanHoorde, M.P. Chenard, M. Mareel, J.M. Foidart, P. Basset, M.C. Rio, Stromelysin-3 expression promotes tumor take in nude mice, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1924–1930.
- [19] N. Farrelly, Y.J. Lee, J. Oliver, C. Dive, C.H. Streuli, Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 1337–1348.
- [20] L. Wei, Y.B. Shi, Matrix metalloproteinase stromelysin-3 in development and pathogenesis, *Histol. Histopathol.* 20 (2005) 177–185.
- [21] J.M. Navarro, N. Olmo, J. Turnay, M.T. López-Conejo, M.A. Lizarbe, Differentiation of BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells by sodium butyrate: increase in 5'-nucleotidase activity, *Eur. J. Clin. Invest.* 27 (1997) 620–628.
- [22] N. Olmo, J. Turnay, P. Pérez-Ramos, E. Lecona, J.I. Barrasa, I. López de Silanes, M.A. Lizarbe, In vitro models for the study of the effect of butyrate on human colon adenocarcinoma cells, *Toxicol. In Vitro* 21 (2007) 262–270.
- [23] J.R. Davie, Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate, *J. Nutr.* 133 (2003) 2485S–2493S.
- [24] E. Lecona, J.I. Barrasa, N. Olmo, B. Llorente, J. Turnay, M.A. Lizarbe, Upregulation of annexin A1 expression by butyrate in human colon adenocarcinoma cells: role of p53, NF- κ B, and p38 mitogen-activated protein kinase, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 4665–4674.
- [25] D. Hammill, N. Jain, S. Armstrong, C.R. Mueller, The D-domain of Sp3 modulates its protein levels and activation of the p21(CIP1/WAF1) promoter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335 (2005) 377–384.
- [26] I.M. Clark, T.E. Swinger, D.A. Young, Acetylation in the regulation of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression, *Front. Biosci.* 12 (2007) 528–535.

- [27] J. Turnay, N. Olmo, J.G. Gavilanes, J. Benítez, M.A. Lizarbe, Establishment and characterization of a new human colon adenocarcinoma cell line: BCS-TC2, *Cytotechnology* 3 (1990) 75–88.
- [28] I. López de Silanes, N. Olmo, J. Turnay, G. González de Buitrago, P. Pérez-Ramos, A. Guzmán-Aránguez, M. García-Díez, E. Lecona, M. Gorospe, M.A. Lizarbe, Acquisition of resistance to butyrate enhances survival after stress and induces malignancy of human colon carcinoma cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 4593–4600.
- [29] P. Anglard, T. Melot, E. Guérin, G. Thomas, P. Basset, Structure and promoter characterization of the human stromelysin-3 gene, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20337–20344.
- [30] D. Luo, E. Guerin, M.G. Ludwig, I. Stoll, P. Basset, P. Anglard, Transcriptional induction of stromelysin-3 in mesodermal cells is mediated by an upstream CCAAT/enhancer-binding protein element associated with a DNase I-hypersensitive site, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37177–37185.
- [31] T. Okamoto, S. Takahashi, E. Nakamura, K. Nagaya, T. Hayashi, K. Fujieda, Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in human meningeal cells via ERK and Smad pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383 (2009) 475–479.
- [32] Y. Inoue, Y. Itoh, K. Abe, T. Okamoto, H. Daitoku, A. Fukamizu, K. Onozaki, H. Hayashi, Smad3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transactivation activity, *Oncogene* 26 (2007) 500–508.
- [33] Y. Schavinsky-Khrapunsky, M. Huleihel, M. Aboud, A. Torgeman, Role of protein kinase C and the Sp1-p53 complex in activation of p21(WAF-1) expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human T cells, *Oncogene* 22 (2003) 5315–5324.
- [34] S.W. Blume, R.C. Snyder, R. Ray, S. Thomas, C.A. Koller, D.M. Miller, Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo, *J. Clin. Invest.* 88 (1991) 1613–1621.
- [35] M. Thewes, G. Pohlmann, M. Atkinson, J. Mueller, B. Putz, H. Hoffer, Stromelysin-3 (ST-3) mRNA expression in colorectal carcinomas. Localization and clinicopathologic correlations, *Diagn. Mol. Pathol.* 5 (1996) 284–290.
- [36] K. Jungert, A. Buck, M. Buchholz, M. Wagner, G. Adler, T.M. Gress, V. Ellenrieder, Smad-Sp1 complexes mediate TGF β 1-induced early transcription of oncogenic Smad7 in pancreatic cancer cells, *Carcinogenesis* 27 (2006) 2392–2401.
- [37] W.C. Hung, H.C. Chang, Indole-3-carbinol inhibits Sp1-induced matrix metalloproteinase-2 expression to attenuate migration and invasion of breast cancer cells, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 76–82.
- [38] Y.J. Chen, W.M. Chang, Y.W. Liu, C.Y. Lee, Y.H. Jang, C.D. Kuo, H.F. Liao, A small-molecule metastasis inhibitor, norcantharidin, downregulates matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting Sp1 transcriptional activity in colorectal cancer cells, *Chem. Biol. Interact.* 181 (2009) 440–446.
- [39] I.C. Sroka, R.B. Nagle, G.T. Bowden, Membrane-type 1 matrix metalloproteinase is regulated by sp1 through the differential activation of AKT, JNK, and ERK pathways in human prostate tumor cells, *Neoplasia* 9 (2007) 406–417.
- [40] M.A. Glozak, N. Sengupta, X. Zhang, E. Seto, Acetylation and deacetylation of non-histone proteins, *Gene* 363 (2005) 15–23.
- [41] M. Pavlaki, S. Zucker, A. Dufour, N. Calabrese, W. Bahou, J. Cao, Furin functions as a nonproteolytic chaperone for matrix metalloproteinase-28: MMP-28 propeptide sequence requirement, *Biochem. Res. Int.* 2011 (2011) 630319.
- [42] D. Pei, S.J. Weiss, Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen, *Nature* 375 (1995) 244–247.
- [43] M.M. Barbacid, P. Fernández-Resa, J.M. Buesa, G. Márquez, M. Aracil, A.R. Quesada, E. Mira, Expression and purification of human stromelysin 1 and 3 from baculovirus-infected insect cells, *Protein Expr. Purif.* 13 (1998) 243–250.
- [44] S.M. Pulkuri, B. Gorantla, J.S. Rao, Inhibition of histone deacetylase activity promotes invasion of human cancer cells through activation of urokinase plasminogen activator, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 35594–35603.
- [45] S.L. Pender, J.J. Quinn, L.R. Sanderson, T.T. MacDonald, Butyrate upregulates stromelysin-1 production by intestinal mesenchymal cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279 (2000) G918–G924.
- [46] N.J. Emenaker, M.D. Basson, Short chain fatty acids inhibit human (SW1116) colon cancer cell invasion by reducing urokinase plasminogen activator activity and stimulating TIMP-1 and TIMP-2 activities, rather than via MMP modulation, *J. Surg. Res.* 76 (1998) 41–46.
- [47] J.C. Lee, M.C. Maa, H.S. Yu, J.H. Wang, C.K. Yen, S.T. Wang, Y.J. Chen, Y. Liu, Y.T. Jin, T.H. Leu, Butyrate regulates the expression of c-Src and focal adhesion kinase and inhibits cell invasion of human colon cancer cells, *Mol. Carcinog.* 43 (2005) 207–214.
- [48] J. Redondo-Muñoz, E. Ugarte-Berzal, M.J. Terol, P.E. Van den Steen, M. Hernández del Cerro, M. Roderfeld, E. Roeb, G. Opdenakker, J.A. García-Marco, A. García-Pardo, Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain, *Cancer Cell* 17 (2010) 160–172.
- [49] M.D. Martin, L.M. Matrisian, The other side of MMPs: protective roles in tumor progression, *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 717–724.
- [50] J. Decock, S. Thirkettle, L. Wagstaff, D.R. Edwards, Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer, *J. Cell. Mol. Med.* 15 (2011) 1254–1265.
- [51] J.S. Waby, H. Chirakkal, C. Yu, G.J. Griffiths, R.S. Benson, C.D. Bingle, B.M. Corfe, Sp1 acetylation is associated with loss of DNA binding at promoters associated with cell cycle arrest and cell death in a colon cell line, *Mol. Cancer* 9 (2010) 275.
- [52] G.E. Walker, E.M. Wilson, D. Powell, Y. Oh, Butyrate, a histone deacetylase inhibitor, activates the human IGF binding protein-3 promoter in breast cancer cells: molecular mechanism involves an Sp1/Sp3 multiprotein complex, *Endocrinology* 142 (2001) 3817–3827.
- [53] W. Huang, S. Zhao, S. Ammanamanchi, M. Brattain, K. Venkatasubbarao, J.W. Freeman, Trichostatin A induces transforming growth factor β type II receptor promoter activity and acetylation of Sp1 by recruitment of PCAF/p300 to a Sp1.NF- κ B complex, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10047–10054.
- [54] N. Lu, S. Carracedo, J. Ranta, R. Heuchel, R. Soininen, D. Gullberg, The human α 11 integrin promoter drives fibroblast-restricted expression in vivo and is regulated by TGF- β 1 in a Smad- and Sp1-dependent manner, *Matrix Biol.* 29 (2010) 166–176.
- [55] A.W. Tu, K. Luo, Acetylation of Smad2 by the co-activator p300 regulates activin and transforming growth factor β response, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 21187–21196.
- [56] S. Ammanamanchi, M.G. Brattain, Restoration of transforming growth factor- β signaling through receptor RI induction by histone deacetylase activity inhibition in breast cancer cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 32620–32625.
- [57] D. Scharlau, A. Borowicki, N. Habermann, T. Hofmann, S. Klenow, C. Miene, U. Munjal, K. Stein, M. Glei, Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre, *Mutat. Res.* 682 (2009) 39–53.
- [58] M.P. Vincenti, C.E. Brinckerhoff, Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 355–364.

4.2.5. Resultados adicionales

Expresión de MMP-11 en células resistentes a butirato

Se ha abordado el estudio de la expresión de la MMP-11 en las células BCS-TC2.BR2 resistentes a los efectos apoptóticos del butirato. Se han analizado los niveles de proteína en medios condicionados de células tratadas con butirato y TSA, comprobándose que los cambios son mucho menos acusados a los observados en las células BCS-TC2 (Figura 11A). En este caso, el tratamiento con butirato promueve un pequeño incremento tanto en la proenzima como en la enzima activa, mientras que la TSA induce un aumento de la forma activa y un descenso en la proenzima. Este último hecho puede ser consecuencia, no de cambios en la expresión proteica, sino de una activación incrementada del zimógeno.

Por otra parte, se ha analizado la transcripción basal mediante ensayos de luciferasa dual empleando las diferentes construcciones que se analizaron en las células BCS-TC2 (Figura 11B). En este caso los resultados son prácticamente idénticos entre células sensibles y células resistentes. La construcción de menor tamaño (0,1-ST3) es la que muestra niveles más altos de actividad, no existiendo diferencias respecto a la construcción 0,45-ST3. La actividad disminuida en el fragmento de mayor tamaño (2,5-ST3) indica la existencia de elementos represores distales, entre los que se encuentra un sitio AP1, ya que su eliminación en la construcción 2,5 Δ AP1-ST3 conlleva un incremento en la actividad basal.

El tratamiento con butirato y TSA promueve un incremento en la actividad transcripcional con todas las construcciones empleadas (Figura 11C). A diferencia de lo observado en las células sensibles, en las células BCS-TC2.BR2 este efecto es mucho más acusado cuando se analizan los fragmentos 2,5 Δ AP1-ST3 y 2,5-ST3, lo que indica la existencia de elementos distales de activación por butirato que sólo responderían a factores presentes en las células resistentes. Dado que estos cambios en la activación transcripcional no se corresponden con un incremento en los niveles proteicos, se deduce que deben existir otros mecanismos postranscripcionales que regulen la expresión de la MMP-11 en estas células. El tratamiento de las células BCS-TC2.BR2 transfectadas con el fragmento 0,1-ST3 con diferentes concentraciones de butirato pone de manifiesto que la activación transcripcional es dependiente de concentración, alcanzándose la saturación a una concentración 2 mM (Figura 11D).

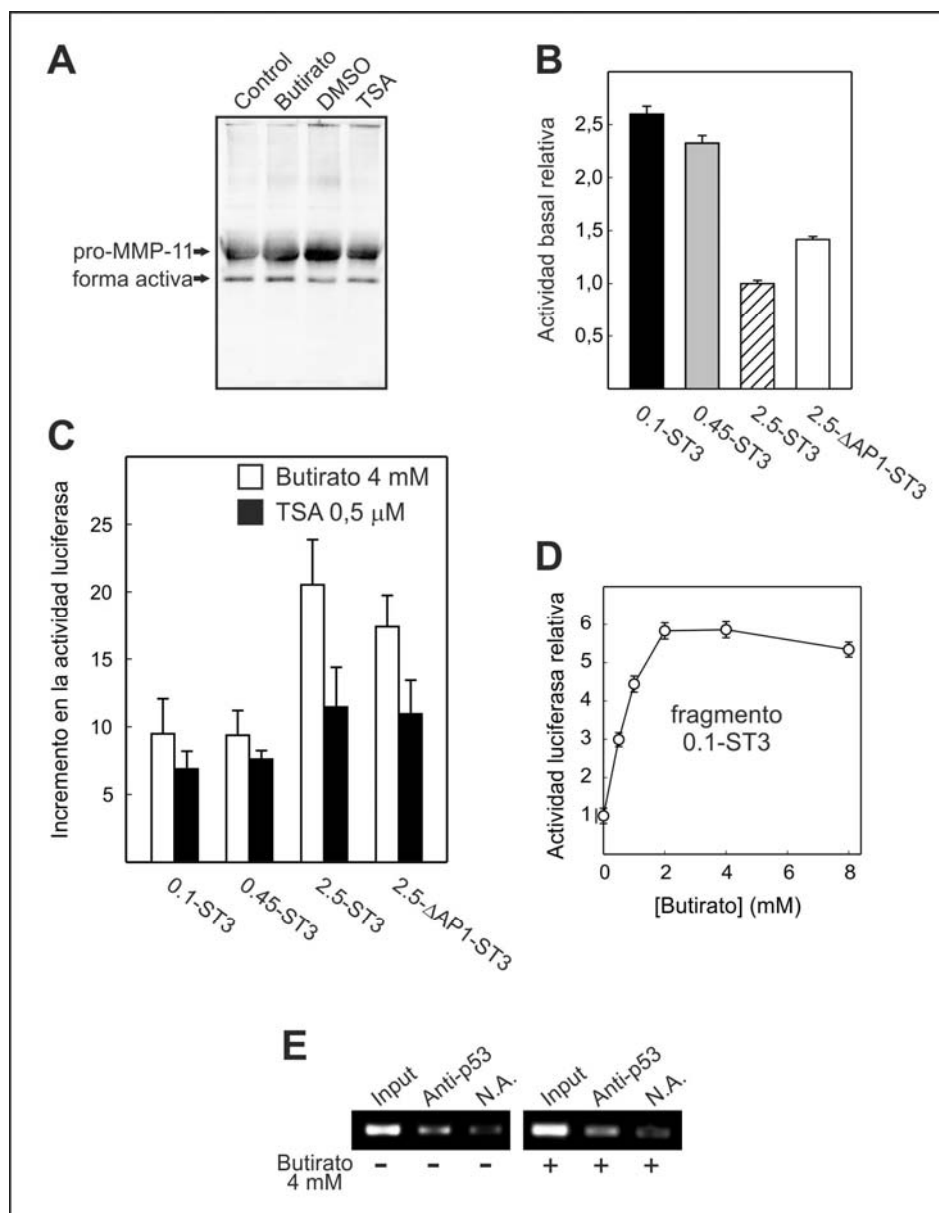


Figura 11. Expresión de MMP-11 en células BCS-TC2.BR2. Efecto de inhibidores de HDAC.

(A) Detección de MMP-11 por *Western blot* en medios condicionados obtenidos tras el tratamiento de las células BCS-TC2.BR2 con butirato 4 mM y TSA 0,5 μM durante 48 h. Los controles para el tratamiento con TSA se incubaron con la misma concentración de DMSO que en las células tratadas. (B) Actividad basal de diferentes construcciones del promotor α -MMP-11 en las células BCS-TC2.BR2. La medida se realizó mediante ensayos de luciferasa dual en células en fase exponencial de crecimiento. Los datos se expresan en unidades arbitrarias, tomando como 1 la actividad correspondiente al fragmento 2,5-ST3. (C) Efecto del tratamiento con butirato y TSA (24 h) sobre la actividad luciferasa de cada uno de los fragmentos del promotor α -MMP-11. Los datos representan el número de veces que se incrementa la actividad de cada construcción respecto a su control sin tratamiento. (D) Efecto dependiente de concentración del tratamiento con butirato durante 24 h sobre la actividad transcripcional del fragmento 0,1-ST3. Los datos se expresan como número de veces que se incrementa la actividad luciferasa respecto al control sin tratamiento. (E) Ensayos de ChIP para confirmar la interacción de p53 con el promotor α -MMP-11 en células control o tratadas con butirato durante 24 h. Las muestras inmunoprecipitadas se analizaron por PCR empleando los cebadores especificados en Materiales y Métodos (ChIP-p53up).

Dadas las diferencias observadas entre ambas líneas celulares en la activación por butirato, se ha realizado un análisis de predicción de sitios de unión para diferentes factores de transcripción en las regiones distales del promotor de la MMP-11. Se han detectado dos elementos de respuesta para p53 en las posiciones -640 y -1320. Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina con extractos de las células BCS-TC2 ponen de manifiesto que p53 se une únicamente al sitio en posición -640 (Figura 11E), aunque el tratamiento con butirato no parece inducir ningún cambio significativo en la interacción de p53 con el promotor. La realización de estos ensayos con extractos de las células BCS-TC2.BR2 permitirán comprobar si existen diferencias en la interacción de p53 respecto a las células sensibles.

Análisis del promotor de la isoforma β -MMP-11

En el año 2002 se describió por primera y única vez la existencia de una segunda isoforma de la MMP-11 (β -MMP-11 o β -ST3) generada por *splicing* alternativo y por el uso de promotores alternativos; esta isoforma se expresa intracelularmente de forma constitutivamente activa. Se ha detectado la expresión del mRNA por RT-PCR cuantitativa, observándose que la transcripción de esta isoforma se duplica en presencia de butirato y aumenta alrededor de 5 veces tras el tratamiento con TSA en células BCS-TC2 (Figura 12A). Aunque los anticuerpos empleados para la detección de la isoforma clásica (α -MMP-11) son capaces de reconocer también la isoforma β -MMP-11 al ir dirigidos frente a un epítipo presente en la región C-terminal, no se ha detectado esta isoforma ni en extractos celulares ni en medios condicionados de ninguna de las líneas celulares empleadas. Estos datos sugieren que, o bien el tiempo de vida media de este mRNA es muy bajo, o bien que existen mecanismos postranscripcionales que impiden la correcta traducción del mismo.

Dada la disponibilidad de diferentes construcciones del promotor de esta isoforma β -MMP-11 (Figura 12B), se ha abordado su análisis en nuestro modelo celular. Ensayos de luciferasa dual con los diferentes fragmentos del promotor de la isoforma β -MMP-11 han demostrado que estas construcciones son activas transcripcionalmente, observándose la menor actividad con el fragmento de mayor longitud (Figura 12C). Este hecho indica la existencia de elementos represores distales en dicho promotor, entre ellos AP1, cuya eliminación induce un incremento en la transcripción. Además, la actividad basal es ligeramente superior en las células

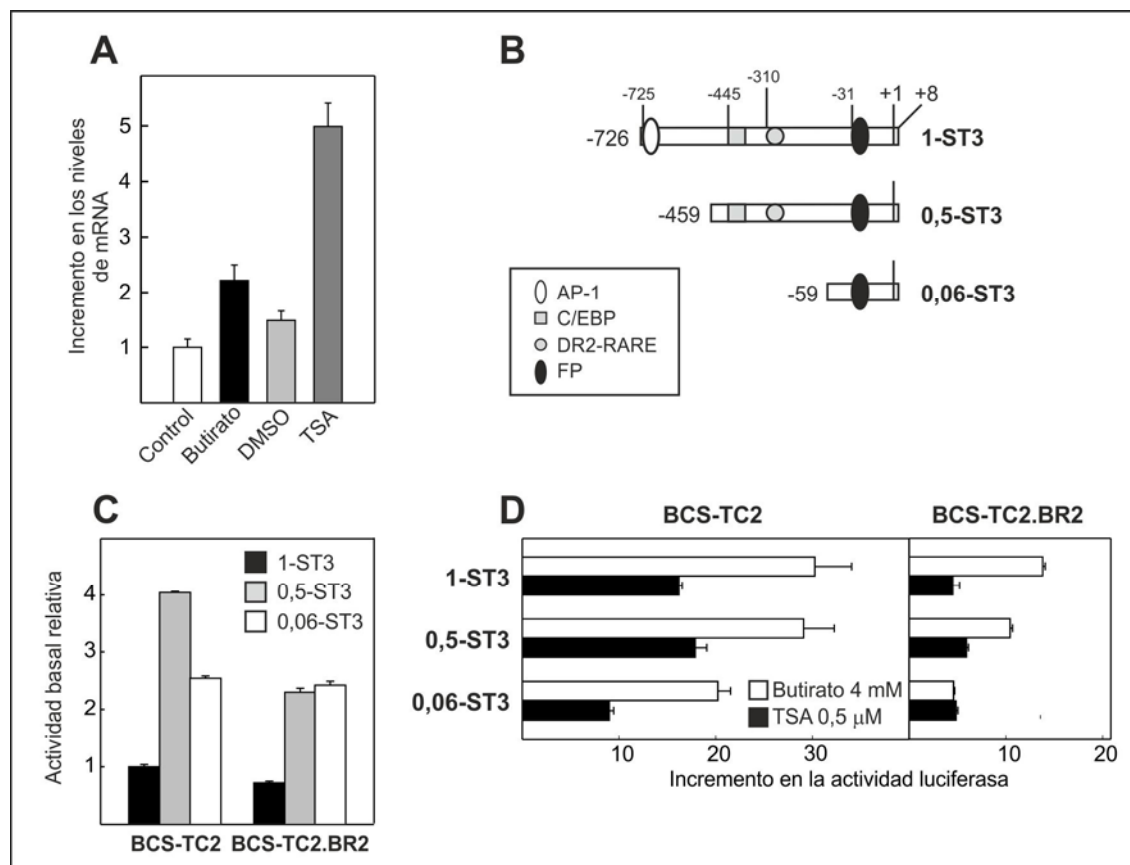


Figura 12. Actividad transcripcional del promotor β -MMP-11 en presencia y ausencia de inhibidores de HDAC.

(A) RT-PCR cuantitativa tras el tratamiento de las células BCS-TC2 con butirato 4 mM y TSA 0,5 μ M durante 24 h, para determinar los niveles de mRNA. Los datos se normalizan respecto a los niveles de rRNA 18S y se asigna un valor de 1 al control sin tratamiento. (B) Esquema de las construcciones del promotor β -MMP-11 empleadas para los ensayos de actividad. La figura muestra las posiciones de comienzo y fin de la región clonada en cada plásmido respecto del sitio de inicio de la transcripción (+1), así como distintos sitios de unión para factores de transcripción. (C) Actividad basal de las diferentes construcciones del promotor β -MMP-11 en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2. Las medidas se realizan mediante ensayos de luciferasa dual en células en fase exponencial de crecimiento. Los datos se expresan en unidades arbitrarias, tomando como 1 la actividad correspondiente al fragmento 1-ST3. (D) Efecto del tratamiento con butirato y TSA (24 h) sobre la actividad luciferasa de cada uno de los fragmentos del promotor β -MMP-11 en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2. Los datos representan el número de veces que se incrementa la actividad de cada construcción respecto a su control sin tratamiento.

sensibles, siendo la construcción 0,5-ST3 la más activa de las tres. Dado que en las células BCS-TC2.BR2 no se observan diferencias entre las construcciones 0,06-ST3 y 0,5-ST3, estos resultados sugieren la existencia de algún elemento activador en el fragmento 0,5-ST3 al cual sólo responden las células sensibles.

Por otro lado, el tratamiento con butirato y TSA promueve la activación transcripcional de todas las construcciones en ambas líneas celulares, siendo este efecto

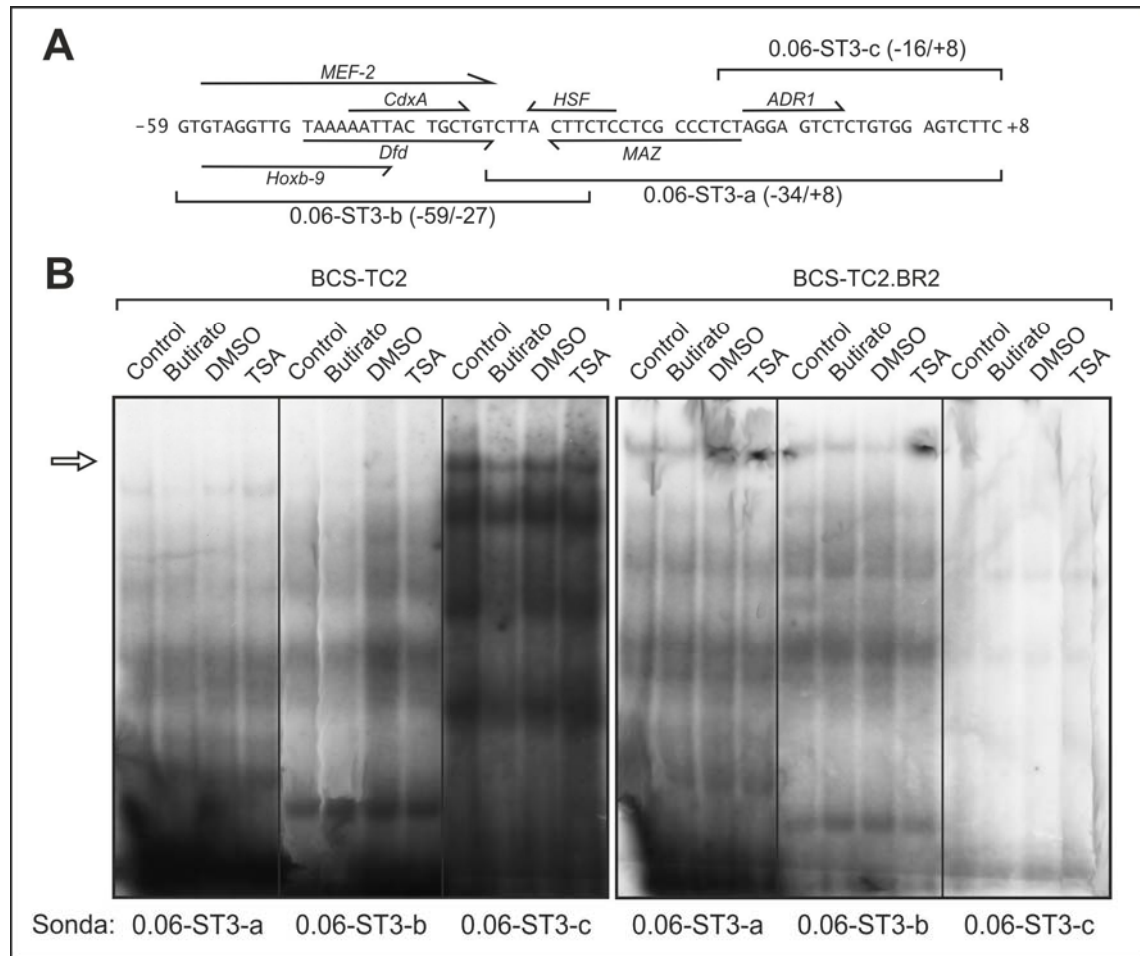


Figura 13. Ensayos EMSA correspondientes al promotor β -MMP-11.

(A) Secuencia del fragmento 0,06-ST3, indicándose los diferentes oligonucleótidos diseñados para los ensayos EMSA. Se muestra la predicción de sitios de unión para varios factores de transcripción. (B) Ensayos EMSA con los diferentes oligonucleótidos diseñados a partir de extractos nucleares obtenidos de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 tras el tratamiento con butirato 4 mM y TSA 0,5 μ M durante 24 h. Los controles para el tratamiento con TSA se incuban con la misma concentración de DMSO que en las células tratadas.

el doble de intenso en las células sensibles respecto a las resistentes (Figura 12D). En las células BCS-TC2 se observa una inducción de la actividad transcripcional en la construcción 0,06-ST3 de 10 y 20 veces con TSA y butirato, respectivamente, siendo todavía mayor el incremento con las construcciones 0,5-ST3 y 1-ST3. En cambio, en las células BCS-TC2.BR2, la TSA induce únicamente un incremento transcripcional de 5 veces para los tres fragmentos empleados, mientras que el butirato aumenta la actividad transcripcional a medida que incrementa el tamaño del fragmento de promotor. De todos estos resultados se deduce la existencia de elementos de respuesta a butirato en el promotor de la isoforma β -MMP-11 para los cuales las dos líneas celulares empleadas responden diferencialmente.

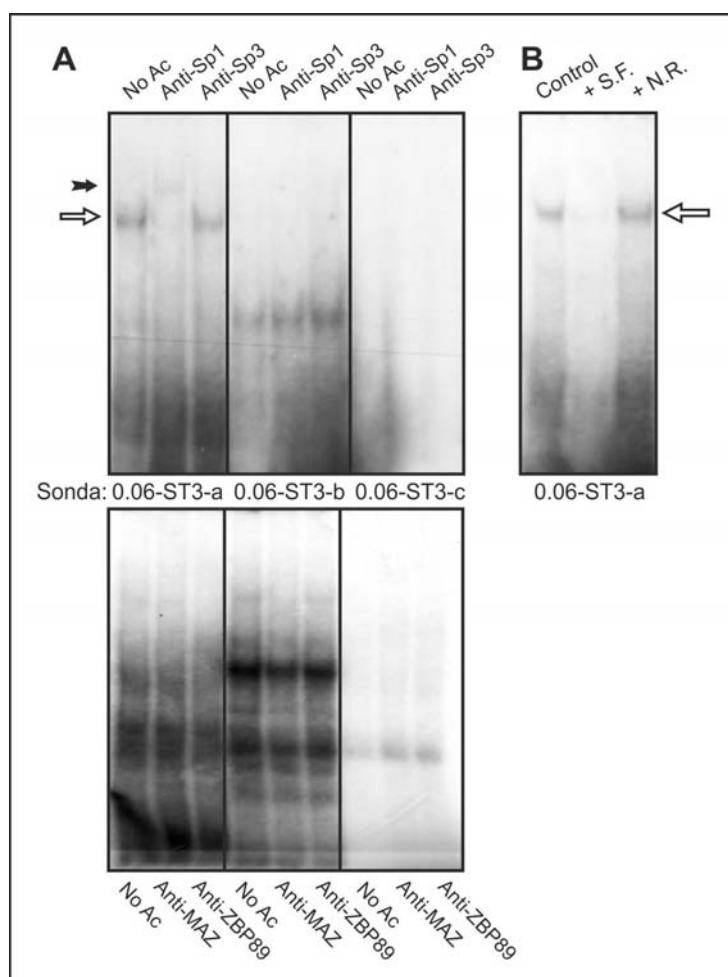


Figura 14. Ensayos de superretardo y competición para el promotor β -MMP-11.

(A) Ensayos de superretardo utilizando extractos nucleares de las células BCS-TC2, con los oligonucleótidos descritos en la Figura 3 y empleando anticuerpos específicos frente a Sp1 y Sp3 (panel superior), y MAZ y ZABP-89 (panel inferior). La interacción del anticuerpo Sp1 con el oligonucleótido 0,06-ST3-a da lugar a una disminución en la intensidad de una de las bandas de movilidad retardada (flecha blanca) y a la aparición de una nueva banda de superretardo (flecha negra). Con el resto de anticuerpos no se observa ningún cambio significativo. (B) Ensayo de competición con el oligonucleótido 0,06-ST3-a. Extractos nucleares de las células BCS-TC2 se incuban en presencia del mismo oligonucleótido no marcado radiactivamente (S.F.; sonda fría) o de un oligonucleótido con una secuencia no relacionada (N.R.) para comprobar la especificidad de la banda de movilidad retardada.

Dada la presencia de estos elementos de respuesta a butirato en el fragmento de promotor de menor tamaño (0,06-ST3) se ha abordado un estudio similar al realizado con la isoforma clásica α -MMP-11. Para ello se ha analizado mediante programas de predicción la posible presencia de sitios de unión para factores de transcripción. Los resultados obtenidos no predijeron la presencia de sitios de unión de factores de transcripción relacionados con la respuesta a butirato con la excepción de un sitio MAZ (Figura 13A). Por tanto, se ha llevado a cabo un análisis mediante EMSA y superretardo

para determinar posibles interacciones. Los EMSA no mostraron cambios ni en la intensidad ni en la movilidad de ninguna de las bandas observadas (Figura 13B). Finalmente, los ensayos de superretardo con los mismos factores empleados para el estudio de la isoforma α -MMP-11 (todos ellos capaces de unirse al DNA a través de secuencias ricas en GC presentes también en este promotor), ponen de manifiesto que ni MAZ, ni ZBP89, ni Sp3 se unen al promotor β -MMP-11, mientras que Sp1 sí genera una banda de movilidad retardada indicando su unión a la sonda 0.06-ST3-a (Figura 14A). Además, los ensayos de competición con sonda no marcada y sonda no relacionada en secuencia, demuestran que esta banda de movilidad retardada es específica (Figura 14B).

5. DISCUSIÓN

5.1. APOPTOSIS INDUCIDA POR ÁCIDOS BILIARES

El efecto citotóxico de los ácidos biliares ha sido ampliamente estudiado en hepatocitos, mientras que los datos relativos a células del tracto intestinal son relativamente escasos. Dadas las crecientes evidencias del potencial carcinogénico de estos agentes, principalmente en procesos de tumorigénesis colorrectal, es necesario realizar un análisis más extensivo de los mecanismos de control celular en los que los ácidos biliares se encuentran implicados. Gran parte de la información disponible al respecto se recoge en el trabajo de revisión bibliográfica incluido en esta Memoria de Tesis Doctoral, pero además, empleando nuestro modelo celular de adenocarcinoma de colon humano, hemos sido capaces de profundizar en las respuestas celulares a estos agentes.

El tratamiento de células BCS-TC2 con DCA y CDCA promueve una pérdida de viabilidad de forma dependiente de tiempo y concentración, observándose siempre un efecto más acusado en el caso del CDCA. Aunque los mecanismos no se conocen en profundidad, varios estudios relacionan la mayor citotoxicidad del CDCA con su naturaleza más hidrofóbica en comparación a la de otros ácidos biliares. En cualquier caso, las alteraciones celulares observadas permiten concluir que la muerte celular promovida por los ácidos biliares en estas células ocurre por un fenómeno de apoptosis. Así, se ha podido constatar una pérdida de adhesión celular, pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, la fragmentación del DNA cromosómico y la degradación de dianas proteicas de caspasas como PARP o lámina B1. Además se ha comprobado que la ruta apoptótica activada por los ácidos biliares es la conocida como ruta intrínseca o mitocondrial. Esto se deduce de la pérdida de potencial mitocondrial y activación de la caspasa-9.

Aunque se ha descrito que los hepatocitos son capaces de responder a los ácidos biliares a través de CD95, en nuestro caso no hemos detectado activación de la caspasa-8, principal caspasa iniciadora de esta vía apoptótica. Existen varios estudios que ponen de manifiesto los efectos apoptóticos de los ácidos biliares de forma independiente de los receptores de muerte en células de colon (Schlottman y col., 2000; Wachs y col., 2005). Así, se ha observado que los ácidos biliares son capaces de promover apoptosis en las células Caco-2 y SW620, que no expresan CD95. Por otra parte, células que sí expresan CD95, como las HT-29 y SW480, no sufren apoptosis tras el tratamiento con el anticuerpo anti-Fas CH11, que se comporta como agonista de dicho receptor

(Schlottman y col., 2000). Es más, se ha propuesto que las células de cáncer de colon disminuyen la expresión de CD95 en su superficie o bien este tipo de células desarrolla estrategias para inhibir la ruta de señalización de CD95, con el fin de escapar a la muerte provocada por linfocitos citotóxicos infiltrados en el tumor (Wachs y col., 2005).

Cabe mencionar que se ha detectado activación de la caspasa-8 en diferentes líneas celulares de cáncer de colon tras tratamiento con ácidos biliares. Estos resultados contrastan con los mencionados anteriormente. En relación a este hecho se han descrito diferentes mecanismos de activación de la caspasa-8, como la activación directa por ácidos biliares o a través de caspasas previamente activas debido a perturbaciones en el potencial de membrana mitocondrial, como la caspasa-9 (Schlottman y col., 2000). Por otro lado, también se ha apoyado la teoría de que la apoptosis inducida por ácidos biliares es dependiente de CD95 en células HT-29 y HCT-116 debido a la actividad enantioespecífica de diferentes enantiómeros sintéticos del LCA, del DCA y del CDCA, así como por su capacidad para activar a la caspasa-8 (Katona y col., 2009). Estos estudios señalan el hecho de que tras el tratamiento con diferentes ácidos biliares, la consiguiente producción de ROS puede provocar la translocación y oligomerización de CD95 dependiente de EGFR y la correspondiente activación de la caspasa-8.

En cambio existen numerosos trabajos en varias líneas celulares de cáncer de colon que relacionan el tratamiento con los ácidos biliares con perturbaciones mitocondriales que derivan en fenómenos de apoptosis, lo que apoya los resultados observados en nuestro modelo celular. Esta ruta apoptótica es probablemente la mejor caracterizada en células de cáncer de colon. Así, diferentes estudios mencionan la capacidad de los ácidos biliares para inducir cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial con la consiguiente liberación de moléculas proapoptóticas, como citocromo c o SMAC/Diablo, al citosol. En este sentido, la apoptosis inducida por ácidos biliares a través de la ruta mitocondrial ya ha sido previamente descrita en las líneas celulares de cáncer de colon HCT-116, HT-29, Caco-2, SW480 y SW620 (Washo-Stultz y col., 2002; Wachs y col., 2005; Payne y col., 2007).

En células BCS-TC2 los ensayos de viabilidad y valoración de especies reactivas de oxígeno en presencia y ausencia de inhibidores específicos de enzimas de membrana sugieren que la apoptosis inducida por DCA y CDCA se origina por estrés oxidativo. Los ácidos biliares activan estas enzimas, principalmente a las NAD(P)H oxidasas y a la PLA₂, promoviendo la formación de especies reactivas de oxígeno. Esta situación

conduce a la transición de permeabilidad mitocondrial, de manera que se liberan factores proapoptóticos desde la mitocondria al citoplasma. El ensamblaje del apoptosoma promueve la activación de la caspasa-9 que, a su vez, procesa y activa a la caspasa-3 efectora, poniendo en marcha toda la maquinaria apoptótica. La activación de enzimas de membrana por ácidos biliares se ha descrito en varios estudios, habiéndose sugerido que estos mecanismos derivan de la alteración en la estructura y propiedades fisicoquímicas de la membrana plasmática en las regiones donde se encuentran dichas enzimas, o bien al promover translocaciones y cambios en la localización subcelular de las mismas (Lau y col., 2005). En este sentido, se ha descrito que el tratamiento de las células HCT-116 con ácidos biliares, principalmente el DCA, promueve la liberación de citocromo c de la mitocondria por un mecanismo aún no identificado pero específico (Yui y col., 2005). Se ha propuesto que dicho mecanismo consiste en que el DCA promueve un incremento en la producción de ROS por activación de las NAD(P)H oxidasas o la PLA₂ que se encuentran asociadas a la membrana plasmática, con el consiguiente estrés oxidativo, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación de factores proapoptóticos (Payne y col., 2007).

Por otro lado, se ha descrito que el incremento en ROS también puede ocurrir por daño mitocondrial directo inducido por los ácidos biliares a través de diferentes mecanismos, como generación endógena de ácido araquidónico, producción de Bid truncado (tBid) activación del receptor Fas de forma independiente de ligando, liberación de Bak del retículo endoplásmico, el propio incremento de ROS, o la disminución de los niveles mitocondriales de NAD⁺ por activación de la PARP inducida por daño en el DNA (Bernstein y col., 2005). Apoyando esta hipótesis, se describió que el tratamiento con diferentes inhibidores de los complejos mitocondriales I a IV protege a las células HCT-116 frente a la apoptosis inducida por el DCA (Payne y col., 2005). Además, la rotlerina (inhibidor de PKC) parece mostrar actividad antioxidante y es también capaz de proteger de forma muy efectiva a las células HCT-116 frente a los efectos genotóxicos del DCA (Longpre y Loo, 2008). Finalmente, llama la atención el hecho de que el DCA es capaz de inducir apoptosis a través de la ruta mitocondrial en las células HCT-116 en ausencia de Bax (Yui y col., 2008). Aunque Bax es uno de los miembros proapoptóticos más importante de la familia Bcl-2, cuya oligomerización promueve la aparición de poros en la membrana mitocondrial, se ha propuesto que un incremento en la producción de ROS tras el tratamiento con DCA es

suficiente para promover la transición de permeabilidad mitocondrial y la consiguiente liberación de citocromo c de forma independiente de Bax.

Pero, en nuestro caso, hemos observado que esta respuesta apoptótica se amplifica a través de Bax, como demuestran los ensayos de activación de esta proteína en presencia y ausencia de inhibidores de caspasas. Una vez activa, la caspasa-3 degrada a la proteína antiapoptótica Bcl-2 que, generalmente, mantiene secuestrado a Bax impidiendo su oligomerización (Degli Esposti y Dive, 2003). En ausencia de Bcl-2, Bax queda libre para oligomerizar y formar poros adicionales en la mitocondria. De este modo la señal apoptótica sufre un proceso de retroalimentación positiva, ya que la formación de poros dependientes de Bax promueve un incremento en la liberación de factores proapoptóticos desde la mitocondria al citoplasma. Nuestro modelo apoya la hipótesis de que los ácidos biliares inducen la ruta intrínseca de apoptosis por estrés oxidativo promoviendo alteraciones directas sobre la mitocondria. La activación de Bax es un evento secundario que ocurre tras el ensamblaje del apoptosoma y la posterior degradación de Bcl-2 por las caspasas activas, suponiendo por tanto un mecanismo de amplificación de la respuesta. Finalmente, la pérdida masiva de funcionalidad mitocondrial conduce en último término a una depleción tan acusada en los niveles de ATP que las células acaban sufriendo un proceso de necrosis secundaria con liberación de su contenido al medio extracelular.

Estos mismos estudios se llevaron a cabo con las células BCS-TC2.BR2, que son resistentes a los efectos apoptóticos del butirato. Estudios previos del grupo permitieron comprobar que la resistencia de las células a este inhibidor de HDAC confería resistencia adicional a otros tipos de estrés celular, entre ellos al tratamiento con ácidos biliares (Perez-Ramos y col., 2005; Olmo y col., 2007). Dados los resultados obtenidos en las células parentales sensibles a los efectos del butirato, se propuso comparar los mecanismos a través de los cuales los ácidos biliares inducen apoptosis en ambas líneas celulares, e intentar determinar las características celulares diferenciales que confieren resistencia a las células BCS-TC2.BR2. El tratamiento con el DCA y el CDCA a tiempos cortos (< 2 horas) también promueve apoptosis en esta línea celular, pero sus efectos son menos acusados respecto a las células sensibles. Los resultados corroboran que los mecanismos a través de los cuales los ácidos biliares inducen el proceso apoptótico son los mismos en ambas líneas celulares, ya que en las células BCS-TC2.BR2 también se ha observado una activación de las enzimas de membrana NAD(P)H oxidasas y de la PLA₂, el consiguiente incremento en las especies reactivas

de oxígeno, pérdida del potencial mitocondrial por transición de permeabilidad, y activación de las caspasas 9 y 3. Sin embargo, debe existir alguna diferencia entre ambos tipos de células que confiera resistencia a las células BCS-TC2.BR2 frente a los efectos apoptóticos de los ácidos biliares.

El análisis de los niveles proteicos de diferentes miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 ha puesto de manifiesto un hecho muy significativo. Las células BCS-TC2.BR2 muestran una expresión incrementada respecto a las células sensibles de dos proteínas antiapoptóticas: Mcl-1 y, sobre todo, Bcl-2. Como ya se ha mencionado anteriormente, Bcl-2 mantiene secuestrada a Bax impidiendo su oligomerización y la consiguiente formación de poros en la membrana mitocondrial. En este sentido, ensayos de activación de Bax han demostrado que los ácidos biliares no son capaces de activar a esta proteína en las células resistentes a los mismos tiempos y concentraciones que en el caso de las células parentales. Con el fin de demostrar que este hecho se debe a los niveles incrementados de Bcl-2 se han realizado estos mismos ensayos en presencia del inhibidor de Bcl-2 ABT-263 (Navitoclax). Esta molécula mimetiza los dominios BH3 de la familia de proteínas Bcl-2, de manera que interacciona con Bcl-2 impidiendo el secuestro de Bax (Tse y col., 2008). De este modo se ha podido observar un efecto sinérgico en la activación de Bax entre el CDCA y el ABT-263 en ambas líneas celulares, alcanzando las células BCS-TC2.BR2 niveles de activación sólo ligeramente inferiores a los observados en las células parentales. Además, los ensayos de viabilidad tras el tratamiento con el DCA y el CDCA en presencia de ABT-263 conducen a niveles de citotoxicidad muy similares en ambas líneas celulares, lo que sugiere que la inactivación de Bcl-2 supone la pérdida de resistencia frente a estos ácidos biliares.

En conjunto, estos resultados nos permiten sugerir un modelo de apoptosis inducida por ácidos biliares en células de adenocarcinoma de colon humano como se muestra en la Figura 15A. En un evento inicial, los ácidos biliares inducen la activación de enzimas de membrana productoras de ROS, principalmente a las NAD(P)H oxidasas y a la PLA₂, lo que conduce a un estado de estrés oxidativo. Esta situación promueve la transición de permeabilidad mitocondrial con la consiguiente liberación de factores proapoptóticos al citoplasma. Una vez ensamblado el apoptosoma se activa la caspasa-9 iniciadora quien, a su vez, procesa y activa a la caspasa-3 efectora. De este modo esta última puede degradar diferentes dianas proteicas, entre las que se encuentra Bcl-2. Ello conduce a que Bax se encuentre libre para oligomerizar y formar poros adicionales en la membrana mitocondrial, generándose un proceso de retroalimentación positiva. Las

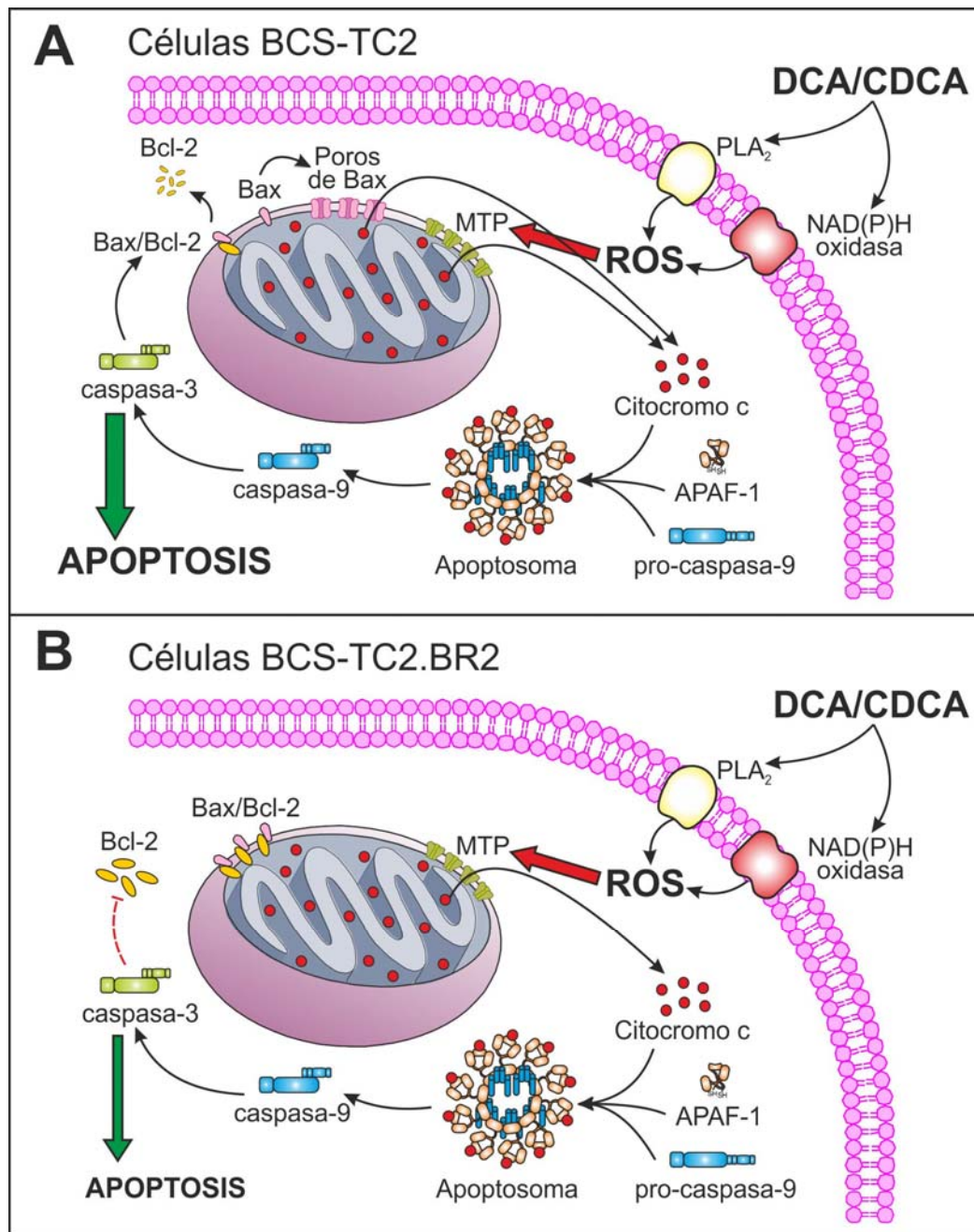


Figura 15. Apoptosis inducida por ácidos biliaries en células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.

Los ácidos biliaries DCA y CDCA promueven la activación de las NAD(P)H oxidasas y de la PLA₂ en células BCS-TC2 (**A**). Estas enzimas promueven estrés oxidativo por incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, lo que conlleva la transición de permeabilidad mitocondrial (MTP). La liberación de factores proapoptóticos (como el citocromo c) al citoplasma promueve el ensamblaje del apoptosoma y la activación de la caspasa-9, lo que conduce a la activación de la caspasa-3 ejecutora y la consiguiente degradación de dianas apoptóticas. La degradación de Bcl-2 dependiente de caspasas promueve la liberación de Bax, de manera que se promueve la formación de poros adicionales en la mitocondria que amplifican la señal apoptótica. La iniciación del programa apoptótico por ácidos biliaries en células BCS-TC2.BR2 (**B**) es similar al observado en las células sensibles pero, en este caso, los niveles elevados de Bcl-2 impiden la formación de poros dependientes de Bax en la mitocondria, disminuyendo la intensidad de la señal apoptótica.

células resistentes (Figura 15B), al expresar mayores niveles de Bcl-2, mantienen a la proteína Bax secuestrada a pesar de la activación de la caspasa-3, de modo que se bloquea esta amplificación de la señal apoptótica observada en las células parentales. El tratamiento con un inhibidor de Bcl-2 es capaz de revertir dicha resistencia alcanzándose niveles de citotoxicidad similares a los observados en células sensibles. Estos resultados pueden ser de gran utilidad práctica, ya que la resistencia a diferentes fármacos de uso clínico derivados del butirato u otros inhibidores de HDAC, podría revertirse potencialmente mediante coadministración del inhibidor oral de Bcl-2 ABT-263 en aquellos tumores donde la expresión de Bcl-2 se encuentre elevada.

Finalmente cabe señalar que hemos detectado la regulación de diferentes rutas de señalización tras el tratamiento con ácidos biliares. Así, se ha observado la fosforilación de las MAPK p38, ERK1/2 y JNK. La activación por ácidos biliares de estas rutas de señalización ya ha sido previamente observada en células de cáncer de colon, y se ha relacionado con una respuesta de supervivencia que pone en marcha la célula para tratar de resistir los efectos citotóxicos de estos agentes (Qiao y col., 2001; Qiao y col., 2003; Araki y col., 2005). Por el contrario, se ha detectado una disminución en los niveles de fosforilación de Akt, principalmente en células BCS-TC2.BR2. En este sentido, se ha descrito una respuesta similar en diferentes líneas celulares tras la generación de estrés oxidativo por diferentes agentes. En estos casos, la pérdida de fosforilación de Akt parece contribuir a la inducción de apoptosis (Redlak y Miller, 2011; Luo y col., 2012).

5.2. EFECTO DEL BUTIRATO EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO

El butirato es un componente fisiológico del lumen intestinal generado por fermentación anaerobia de la fibra. Es considerado el principal regulador de la homeostasis del epitelio colónico no sólo por constituir la fuente de energía básica de los colonocitos, sino también por su capacidad para regular la proliferación, diferenciación y muerte celular (Hamer y col., 2008). Se considera que estas funciones reguladoras se derivan de su habilidad para inhibir la actividad HDAC, lo que puede promover cambios en el perfil de expresión génica (Davie, 2003). Sin embargo, en ciertas ocasiones, puede ocurrir que la célula sea capaz de adquirir una resistencia frente a los efectos apoptóticos del butirato a través de diferentes mecanismos, lo que puede favorecer el proceso de tumorigénesis. Es, por tanto, esencial disponer de modelos

celulares que permitan entender mejor los procesos a través de los cuales se adquiere dicha resistencia. Lamentablemente, en la actualidad existen pocas líneas celulares establecidas en cultivo resistentes al butirato, y la información disponible acerca de ellas es muy escasa.

En nuestro estudio partimos de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano BCS-TC2, poco diferenciada y no tumorigénica (Turnay y col., 1990) y de la línea celular BCS-TC2.BR2 derivada de la anterior por tratamiento continuado con butirato 2 mM, y que muestra resistencia a la inducción de apoptosis por este agente, aunque no a sus efectos sobre la diferenciación celular (Lopez de Silanes y col., 2004). También se parte de la sublínea BCS-TC2.2, obtenida tras co-inyección de células BCS-TC2 con matrigel en ratones atímicos (Lopez-Conejo y col., 1996). Estas células presentan tumorigenicidad intrínseca y un menor grado de diferenciación respecto a las parentales. Pero además, en este trabajo se ha establecido la línea BCS-TC3, capaz de crecer formando esferoides multicelulares de forma espontánea. Esta característica resulta muy interesante puesto que dichos esferoides mimetizan en cierto modo la estructura tridimensional de los tumores reales.

Pudo comprobarse que el tratamiento con butirato promueve tanto diferenciación como apoptosis en células BCS-TC2 y BCS-TC2.2, siendo el efecto mucho más acusado en las primeras. En cambio, las células BCS-TC2.BR2 son prácticamente insensibles a los efectos antiproliferativos de este agente, mientras que su grado de diferenciación incrementa más aún que en el caso de la línea parental BCS-TC2. Se comparó a su vez la respuesta a butirato de la línea celular BCS-TC3 con los esferoides obtenidos a partir de las líneas celulares anteriores por crecimiento en un sustrato no adherente. Los datos obtenidos demuestran que el efecto diferenciador desaparece completamente en esferoides de células BCS-TC3 y BCS-TC2.BR2 que, por otra parte, muestran una gran compactación y estabilidad al volver a cultivarlos sobre un sustrato adherente. En cambio, los esferoides obtenidos a partir de células BCS-TC2 son poco estables y siguen siendo sensibles a la diferenciación inducida por el butirato. Estos resultados indican la importancia de la estructura tridimensional en el efecto de este agente, probablemente debido a la accesibilidad reducida en un entorno compacto como ya se ha observado en otros sistemas y tratamientos. En este sentido, se ha demostrado que la adhesión celular y la densidad de crecimiento y el empaquetamiento en múltiples capas celulares dificultan la capacidad de diferentes agentes anticancerígenos para

penetrar en las zonas menos expuestas del tumor promoviendo la adquisición de resistencias (Grantab y col., 2006).

Estas variaciones en el estado de diferenciación celular y la capacidad proliferativa derivados del tratamiento con butirato se corresponden con un cambio en el perfil de expresión génica de las células BCS-TC2, donde se altera la expresión de unos 150 genes. Dada su capacidad para inhibir la actividad HDAC, el butirato es capaz no solo de modificar la estructura de la cromatina por cambios en el estado de acetilación de las histonas, sino también de alterar la afinidad y actividad de diferentes factores de transcripción que pueden a su vez ser dianas de acetilación (Spange y col., 2009). Numerosos estudios en diferentes modelos celulares ponen de manifiesto que estos cambios en la expresión génica no ocurren de manera inespecífica por inducción de una estructura más relajada de la cromatina que facilite la transcripción de forma global en el genoma (Mariadason y col., 2000). De hecho, sólo se modifica la expresión de un grupo concreto de genes, implicados generalmente en procesos relacionados con proliferación, diferenciación y apoptosis. Este hecho sugiere la existencia de secuencias específicas en los promotores de determinados genes que les hace sensibles a los efectos reguladores de la transcripción por butirato, y que ciertos autores han bautizado como elementos de respuesta a butirato (Bohan y col., 1989). Como se menciona en el apartado 1.4.2.2 de esta Memoria, estos elementos de respuesta pueden ser de dos tipos en los promotores de estos genes: bien como cajas CCAAT, o bien como regiones ricas en GC. Nuestro objetivo fue intentar determinar, empleando genes cuya expresión se modifica por butirato, los mecanismos implicados en la respuesta transcripcional a dicho agente. Pudimos detectar elementos de respuesta de ambas clases en los promotores de dos genes diferentes.

En primer lugar se abordó el análisis del promotor de la anexina A1 y de los efectos del butirato sobre el control de su expresión. De este modo pudo comprobarse que el butirato incrementa la expresión de anexina A1 tanto en células BCS-TC2 como en células BCS-TC2.BR2. Dado que la TSA también genera un efecto similar se deduce que esta respuesta se debe a la inhibición de la actividad HDAC, no observándose diferencias significativas entre ambas líneas celulares. Por otro lado, se ha relacionado la expresión de esta proteína con el estado de diferenciación celular (Rodrigo y col., 2004). En este sentido hemos podido comprobar una correlación directa entre ambos parámetros, de modo que el tratamiento con butirato induce diferenciación en las líneas celulares empleadas, paralelo a un incremento en los niveles de anexina A1.

Además, de los ensayos de actividad con diferentes construcciones del promotor se deduce que las regiones implicadas en la regulación de la transcripción basal y en la activación por inhibidores de HDAC son diferentes. Así, la proteína p53 parece ser la principal responsable para la transcripción basal. A pesar de que sólo se ha localizado una repetición de la secuencia canónica de unión para p53, los ensayos de *ChIP* confirmaron su interacción con esta región del promotor. En este sentido, los niveles basales de anexina A1 pueden relacionarse con los correspondientes de p53. Así, las células BCS-TC2 muestran una expresión elevada no sólo de anexina A1 sino también de p53. Hay que señalar que en estas células, p53 está mutado en uno de sus alelos. Esta mutación (R282W) promueve su acumulación, y no impide la actividad transcripcional del p53 salvaje (Marutani y col., 1999). En cambio, los niveles de anexina A1 en las células Caco-2, que expresan una forma truncada e inactiva de p53, son mucho menores que en las células BCS-TC2. En cualquier caso, deben existir mecanismos postranscripcionales que regulen los niveles de anexina A1, ya que estos son mayores en las células resistentes respecto a las parentales, mientras que la actividad basal transcripcional es superior en estas últimas.

Por el contrario, la regulación por butirato y TSA es más compleja y depende tanto del sitio p53 como de una secuencia CCAAT próxima al punto de inicio de la transcripción. Los ensayos de *ChIP* demostraron que el factor de transcripción que se une a estas cajas CCAAT es NF-YA. Además, a través de estos ensayos y los de co-inmunoprecipitación, se comprobó que NF-YA también es capaz de unirse al sitio p53 por interacción directa con este factor de transcripción. La interacción y cooperación funcional entre NF-YA y p53 se ha descrito en varios genes (Manni y col., 2001; Imbriano y col., 2005). Aunque diferentes trabajos han demostrado el papel activador de NF-YA en promotores relacionados con proliferación, diferenciación y apoptosis tras el tratamiento con inhibidores de HDAC (Hirose y col., 2003; Huang y col., 2005), el efecto de este factor sobre la anexina A1 parece ser el contrario, ya que el butirato promueve la liberación de NF-YA del promotor, mientras que incrementa la activación transcripcional. En células BCS-TC2 aparentemente p53 también ejerce un papel represor en la activación por butirato. Este efecto probablemente sea debido a que, al eliminar el sitio de unión a p53, la accesibilidad de diferentes factores activadores de la transcripción a las cajas CCAAT sea mayor, aunque otra posibilidad es que la eliminación de la secuencia CCAAT próxima a la caja TATA impida la correcta formación del complejo basal de la transcripción.

En ausencia de butirato, los complejos p53/NF-YA son más abundantes en células sensibles que en resistentes, de manera que en las células parentales NF-YA se une al promotor de la anexina A1 principalmente a través del sitio p53, mientras que el tratamiento con butirato promueve la liberación de este factor de transcripción de manera que no se une ni de forma directa ni a través de p53. En cambio, en células BCS-TC2.BR2, NF-YA permanece unido al promotor a través del sitio p53, lo que podría relacionarse con el nivel de acetilación de este último. Aunque la interacción entre p53 y NF-YA sigue ocurriendo en ambas líneas celulares tras el tratamiento con butirato, los resultados sugieren que las células BCS-TC2 muestran mayores niveles de acetilación en p53, lo que favorecería su interacción en solitario al promotor y no a través de complejos con NF-YA. En este sentido, se ha descrito que la acetilación de p53 puede alterar la interacción de este factor con NF-YA promoviendo la activación transcripcional de diferentes genes relacionados con apoptosis (Benatti y col., 2008).

También se ha analizado la implicación de la MAPK p38 en la regulación transcripcional del gen de la anexina A1 dado que se conoce que el butirato es capaz de inducir la fosforilación de esta enzima. Se ha demostrado que la activación de p38 es fundamental para la regulación transcripcional del gen de la anexina A1 por butirato. Los ensayos de *ChIP* en presencia de un inhibidor específico de esta quinasa ponen de manifiesto que la interacción de NF-YA con el promotor es independiente de p38, mientras que es fundamental para la unión de p53. Por otra parte, la liberación de NF-YA del promotor, fenómeno esencial para la activación transcripcional del gen de la anexina A1 por butirato, es igualmente independiente de p38. La pérdida de la interacción directa de NF-YA tras el tratamiento con butirato podría explicarse a través de un efecto represor indirecto de p21, quien es capaz de inhibir la fosforilación de NF-YA por cdk2 (Yun y col., 2003). En este sentido, nuestro grupo ha descrito también un incremento en los niveles de p21 en células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 por efecto del butirato, lo que apoyaría esta hipótesis (Lopez de Silanes y col., 2004).

Por lo tanto, se propone un modelo de regulación del promotor de la anexina A1 donde p53 es fundamental en la actividad transcripcional basal, y NF-YA puede estar unido al promotor de forma directa a través de las cajas CCAAT, o de forma indirecta a través de p53 (Figura 16). El tratamiento con butirato disminuye el estado de fosforilación de NF-YA de forma indirecta a través de p21, lo que favorece la pérdida de unión con las cajas CCAAT. Pero, además, el incremento en los niveles de acetilación de p53 también promueve la separación de los complejos p53/NF-YA, de

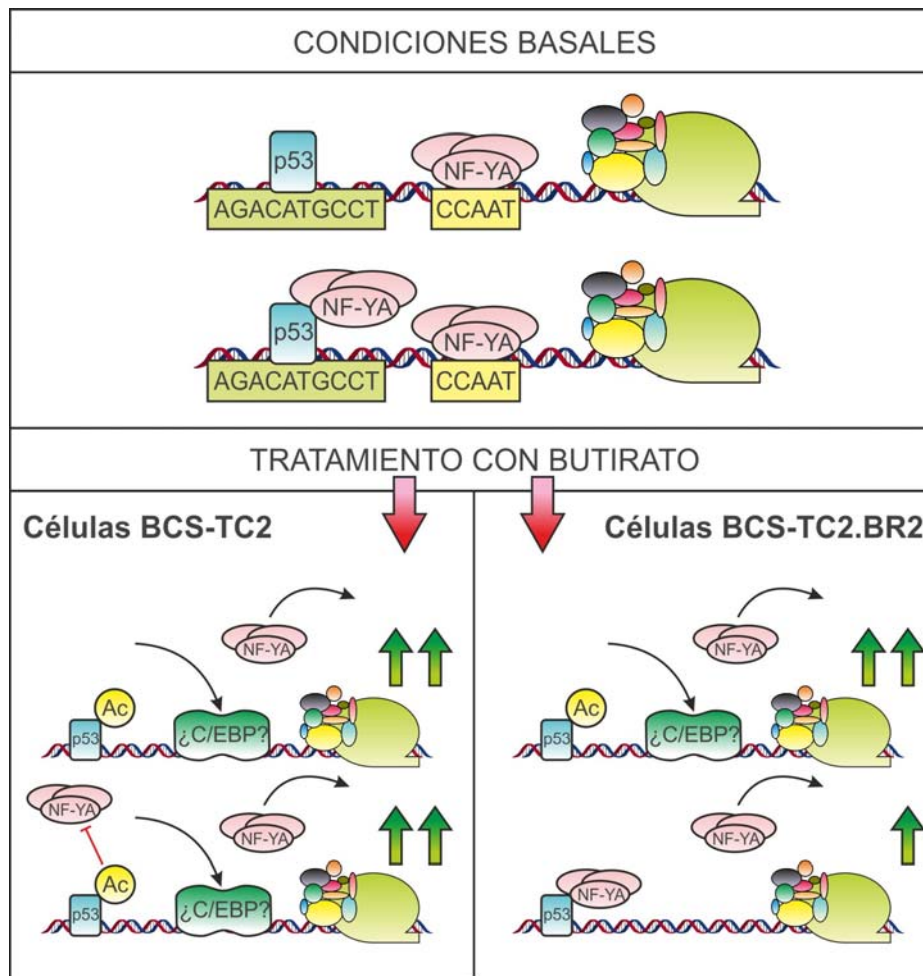


Figura 16. Modelo de regulación del gen de la anexina A1.

El factor de transcripción p53 es fundamental para la actividad basal del promotor de la anexina A1. NF-YA se une también al promotor, bien de manera directa a través de la caja CCAAT, o de forma indirecta formando un complejo con p53. El tratamiento con butirato incrementa la actividad transcripcional por liberación de NF-YA, lo que permite la entrada de otros factores activadores (como C/EBP). El incremento en los niveles de acetilación de p53 tras el tratamiento con butirato impide la interacción de NF-YA con p53, facilitando su salida del promotor. En las células resistentes BCS-TC2.BR2, los niveles de acetilación de p53 son menores, de forma que NF-YA puede seguir interaccionando con él, disminuyendo así la activación transcripcional por butirato.

modo que NF-YA no interacciona con el promotor a través de ninguna de las dos secuencias. Dado que el efecto de NF-YA es represor, su salida permitiría la entrada de potenciales factores activadores de la transcripción de unión a cajas CCAAT. Las células resistentes, al ser menos sensibles a la inhibición de la actividad HDAC por butirato, mantienen ciertos niveles de p53 no acetilado y, por tanto, capaz de acomplejarse con NF-YA permitiendo su unión de forma indirecta al promotor. La inhibición de la MAPK p38 reduce la fosforilación de p53 con la consiguiente

reducción o pérdida de su interacción con el promotor de la anexina A1, lo que disminuye la activación transcripcional por butirato.

Por otro lado, nuestro grupo de investigación había analizado previamente el efecto del butirato sobre la anexina A1, la A2 y la A5 en células de adenocarcinoma de colon humano (Guzman-Aranguez y col., 2005). Uno de los efectos observados tras el tratamiento con butirato era el incremento en la secreción de anexina A5. Dado que el dominio N-terminal de las anexinas es considerado la principal región reguladora de la función de estas proteínas, se planteó estudiar si el dominio N-terminal de la anexina A5 era el responsable de su capacidad para agregar vesículas, ya que dicha actividad está potencialmente relacionada con el proceso de secreción. Esta capacidad de agregación se observa en la anexina A5 de pollo pero no en la de origen humano, por lo que se ha empleado como aproximación metodológica la construcción de una proteína quimérica donde el dominio N-terminal de la anexina A5 humana se sustituye por el de la de pollo, manteniéndose el resto de la secuencia intacta. Además se han usado tanto las formas nativas humana y de pollo, como una anexina A5 recombinante de pollo con el dominio N-terminal deletado. Las 4 proteínas expresadas y purificadas se pliegan correctamente y alcanzan una estructura secundaria similar. Sin embargo sí se han detectado diferencias en la capacidad para interaccionar con vesículas de PS, observándose que las formas nativas interaccionan de modo más eficiente y con menores requerimientos de Ca^{2+} . Esto indica que la modificación del dominio N-terminal puede alterar los sitios para unión de Ca^{2+} y vesículas localizados en el núcleo proteico.

Los espectros de fluorescencia muestran la exposición en presencia de Ca^{2+} del Trp^{187} , que se encuentra generalmente oculto dentro del núcleo proteico. Esta exposición no se observa en la anexina A5 de pollo nativa ni con el dominio N-terminal truncado, probablemente por su menor afinidad por Ca^{2+} . En este sentido, la quimera tampoco muestra un cambio significativo en el espectro de fluorescencia, lo que pone de manifiesto la influencia del dominio N-terminal sobre la estructura completa de la proteína. La afinidad por el Ca^{2+} se incrementa significativamente cuando se forman complejos ternarios con fosfolípidos (Ayala-Sanmartín y col., 2000), lo que se refleja en cambios en el espectro de fluorescencia de las 4 proteínas recombinantes. El máximo de absorción del Trp^{187} se desplaza hacia 340 nm e incrementa el rendimiento cuántico, como ya se ha descrito en otros estudios (Sopkova y col., 1999). Esto se debe a la

pérdida del apantallamiento de este residuo por formación de puentes de hidrógeno con la Thr²²⁴ en la conformación libre de calcio. El cambio conformacional provocado por la unión a calcio, la suave acidificación y la interacción con fosfolípidos expone al Trp¹⁸⁷ al disolvente o a las cabezas polares de los fosfolípidos, rompiendo el enlace con la Thr (Turnay y col., 2002). Por otra parte, la anexina A5 de pollo presenta mayor capacidad para unir vesículas de PS que la humana y, de nuevo, se comprueba que modificaciones del dominio N-terminal alteran esta capacidad, ya que las constantes de disociación aparentes, tanto de la quimera como de la forma de pollo truncada en el dominio N-terminal, son mayores que las de las proteínas nativas.

En relación a la capacidad para inducir agregación de vesículas, como era de esperar, la anexina A5 de pollo induce este proceso incluso a bajas concentraciones de proteína y de calcio, mientras que la proteína humana no muestra esta habilidad. Además, el dominio N-terminal es esencial en esta función, ya que la capacidad de agregación de la anexina A5 de pollo truncada se reduce, mientras que la quimera adquiere dicha actividad, aunque sin alcanzar la misma capacidad de agregación observada en la proteína de pollo nativa. Además, los datos de cinéticas junto a los ensayos de entrecruzamiento ponen de manifiesto que estos fenómenos de agregación ocurren por puentes entre dos proteínas donde cada una de ellas lleva unida una vesícula, y que esta dimerización ocurre a través de la superficie cóncava expuesta del núcleo proteico.

El principal responsable de que la anexina A5 de pollo sea capaz de inducir agregación de vesículas parece ser, por tanto, el dominio N-terminal. Una de las principales diferencias entre los dominios N-terminal de las anexina A5 humana y de pollo, es que esta región presenta una carga neta más negativa en el caso de la humana debido a la sustitución de varios aminoácidos. Datos relativos a la anexina A4, muy relacionada estructural y evolutivamente con la anexina A5 (Moss y Morgan, 2004), y capaz de inducir agregación de vesículas, indican la ausencia de estos residuos con carga negativa (Kaetzel y col., 2001). Es más, su fosforilación puede inducir la pérdida de esta capacidad por incremento en la carga neta negativa. Estos resultados sugieren que la sustitución de aminoácidos ácidos por otros básicos en el dominio N-terminal puede ser responsable de que la anexina A5 de pollo sea capaz de inducir la agregación de vesículas. En cualquier caso, deben existir regiones adicionales en la proteína que participen en esta función, ya que ni la quimera alcanza la misma capacidad de agregación que la anexina A5 de pollo, ni la forma truncada pierde completamente su

funcionalidad. Finalmente, cabe señalar que la superficie cóncava del núcleo proteico, a través de la cual ocurre la interacción entre estas proteínas, también presenta una mayor cantidad de residuos ácidos en la anexina A5 humana respecto a la de pollo, lo que hace pensar que esta carga negativa adicional puede también influir negativamente sobre la capacidad de agregación de la proteína debido a repulsiones electrostáticas.

Otro de los genes cuya regulación por butirato se ha analizado es el de la MMP-11. Aunque la expresión de esta proteína se ha descrito principalmente en células del estroma, en este trabajo se ha demostrado su presencia en medios condicionados de células de adenocarcinoma de colon de origen epitelial. De forma similar al de la anexina A1 se han empleado diferentes construcciones del promotor de la MMP-11 para analizar la regulación de su transcripción basal. Los ensayos de luciferasa ponen de manifiesto que la región reguladora principal se localiza entre las posiciones -110/+15, y que existen elementos represores en regiones distales del promotor, entre los que se encuentra una secuencia de unión para AP-1. Además, el tratamiento con butirato y TSA promueve un incremento en la actividad transcripcional del gen que se correlaciona con un aumento en los niveles de mRNA y proteína, principalmente en su forma activa. Este hecho puede ser debido a una activación extracelular por otras proteasas como la MMP-3 e incluso por activación autocatalítica (del Mar Barbacid y col., 1998). Dado que el butirato se relaciona con efectos beneficiosos frente a la carcinogénesis colorectal, puede parecer contradictorio el hecho de que incrementa los niveles de MMP-11, proteína generalmente asociada con progresión tumoral. Una hipótesis es que las células BCS-TC2 respondan a los efectos apoptóticos del butirato incrementando la expresión de MMP-11 como mecanismo de supervivencia. Apoyando esta idea, se ha descrito que los dominios hemopexina de varias MMP pueden inducir señales de supervivencia por interacción con receptores de membrana (Redondo-Munoz y col., 2010). Aunque, por otro lado, varios estudios sugieren que algunas MMP pueden ejercer un papel protector frente a tumores (Martín y Matrisian, 2007; Decock y col., 2011), lo que podría también explicar el incremento en la expresión de MMP-11 por butirato en células BCS-TC2.

Las regiones proximales del promotor participan en la activación transcripcional por butirato. El análisis de predicción de sitios de unión ha permitido determinar la presencia, entre otros elementos de respuesta, de varias cajas GC cercanas al punto de inicio de la transcripción. Estas secuencias pueden unir diferentes factores de

transcripción relacionados previamente con la respuesta a inhibidores de HDAC, como Sp1, Sp3, MAZ o ZBP-89. Los ensayos de retardo en gel con anticuerpos frente a varios de estos factores han puesto de manifiesto que el factor Sp1 es quien se une a estas cajas GC. En este sentido, varios trabajos han demostrado que Sp1 es un factor importante en el control transcripcional en otros miembros de las MMP, como las MMP-2 y -14 en las cuales Sp1 se une a cajas GC localizadas en regiones proximales del promotor (Sroka y col., 2007; Hung y Chang, 2009), o la MMP-9, en cuyo promotor Sp1 interacciona con cajas GC distales (Chen y col., 2009).

Con el fin de determinar la relevancia de Sp1 en los procesos de regulación transcripcional de este gen, se han considerado dos aproximaciones experimentales. En primer lugar ensayos de luciferasa en presencia de mitramicina, agente que inhibe la unión de Sp1 al DNA. Los resultados obtenidos demuestran que Sp1 es importante tanto para la transcripción basal como para la activación por butirato y TSA. Además, esta inhibición a nivel transcripcional se correlaciona con un descenso en los niveles proteicos en medios condicionados. La segunda aproximación consiste en el diseño de diferentes mutantes para las tres cajas GC de la región proximal del promotor. Los ensayos de luciferasa confirman que dos de estas secuencias ricas en GC son esenciales para la expresión basal del gen (-68/-63 y -41/-36). Por otro lado, la activación transcripcional por butirato parece depender en mayor medida de la caja GC en posición -68/-63, ya que su eliminación reduce drásticamente los efectos inductores del butirato, que llegan a desaparecer por completo cuando esta mutación se combina con la de cualquiera de las otras secuencias de unión a Sp1. Por tanto, estos resultados en conjunto permiten afirmar que Sp1 es fundamental tanto para la actividad basal del gen de la MMP-11, como para la inducción transcripcional por butirato.

Además, el tratamiento con butirato no altera ni los niveles de Sp1 ni su capacidad para interaccionar con el promotor. En este sentido, se ha descrito la activación transcripcional dependiente de Sp1 de diversos genes tras el tratamiento con inhibidores de HDAC, sin que ocurran cambios significativos ni en los niveles proteicos de Sp1, ni en su capacidad para interaccionar con el DNA (Walker y col., 2001; Huang y col., 2005). Así, se han realizado ensayos de inmunoprecipitación con el fin de determinar si la respuesta a butirato está relacionada con alteraciones postraduccionales. Estos ensayos han permitido detectar la presencia de una proteína acetilada acomplejada a Sp1. Teniendo en cuenta la masa molecular de esta proteína, y la información disponible acerca de otros factores de transcripción sujetos a acetilación y cuya

interacción a Sp1 se ha descrito, se ha determinado que esta proteína se corresponde con Smad2. Se ha descrito que Smad2 se puede acetilar por p300, CBP y P/CAF, y su estado de acetilación se ha relacionado con un incremento tanto en su unión al DNA como en sus funciones activadoras de la transcripción (Tu y Luo, 2007). El tratamiento con butirato no solo incrementa el nivel de acetilación de Smad2, sino que este hecho se correlaciona con un incremento en la formación de complejos Sp1/Smad2. Además, los ensayos de *ChIP* corroboran la interacción de Sp1 y Smad2 en el promotor de la MMP-11 a través de las cajas GC. En este sentido, los ensayos de ChIP en presencia de mitramicina muestran que Smad2 puede llegar a interaccionar con el promotor de la MMP-11 en ausencia de Sp1, probablemente a través de una interacción de baja afinidad con alguna secuencia del DNA, o bien por unión indirecta a través de algún otro factor o del propio complejo basal de la transcripción. En cambio, el tratamiento con butirato en presencia de mitramicina desplaza completamente la interacción de Smad2 con el promotor, lo que sugiere que su acetilación por inhibición de la actividad HDAC promueve la formación de complejos con Sp1 que, en estas condiciones, no son capaces de unirse al DNA.

Para profundizar aún más en los mecanismos de regulación por butirato de este gen, también se ha abordado el estudio de las potenciales rutas de señalización implicadas en estos procesos. Ensayos de luciferasa en presencia de varios inhibidores específicos para las tres principales cascadas de MAPK, muestran que la ruta de ERK es esencial para la activación transcripcional por butirato, hecho que se confirma también a nivel de proteína en medios condicionados. En cambio, la inhibición de p38 o JNK no parece tener efectos significativos en la actividad del promotor. Hay que señalar que se ha descrito que la expresión de diversos miembros de la familia de las MMP se puede incrementar por diferentes agentes activadores de MAPK, especialmente de ERK (Vincenti y Brinckerhoff, 2007). Además, se ha podido demostrar que la fosforilación de ERK está incrementada en células de cáncer de colon tras el tratamiento con butirato, siendo dos de sus potenciales dianas de fosforilación tanto Sp1 como Smad (Scharlau y col., 2009).

Por tanto, los resultados obtenidos permiten proponer un modelo de regulación para el promotor de la MMP-11 donde Sp1 es el elemento esencial a través de su unión a las cajas GC (Figura 17). Este factor es fundamental para la transcripción basal, y puede encontrarse interaccionando con el promotor por sí solo, o formando complejos con Smad2. El tratamiento con butirato aumenta el estado de acetilación de Smad2, lo

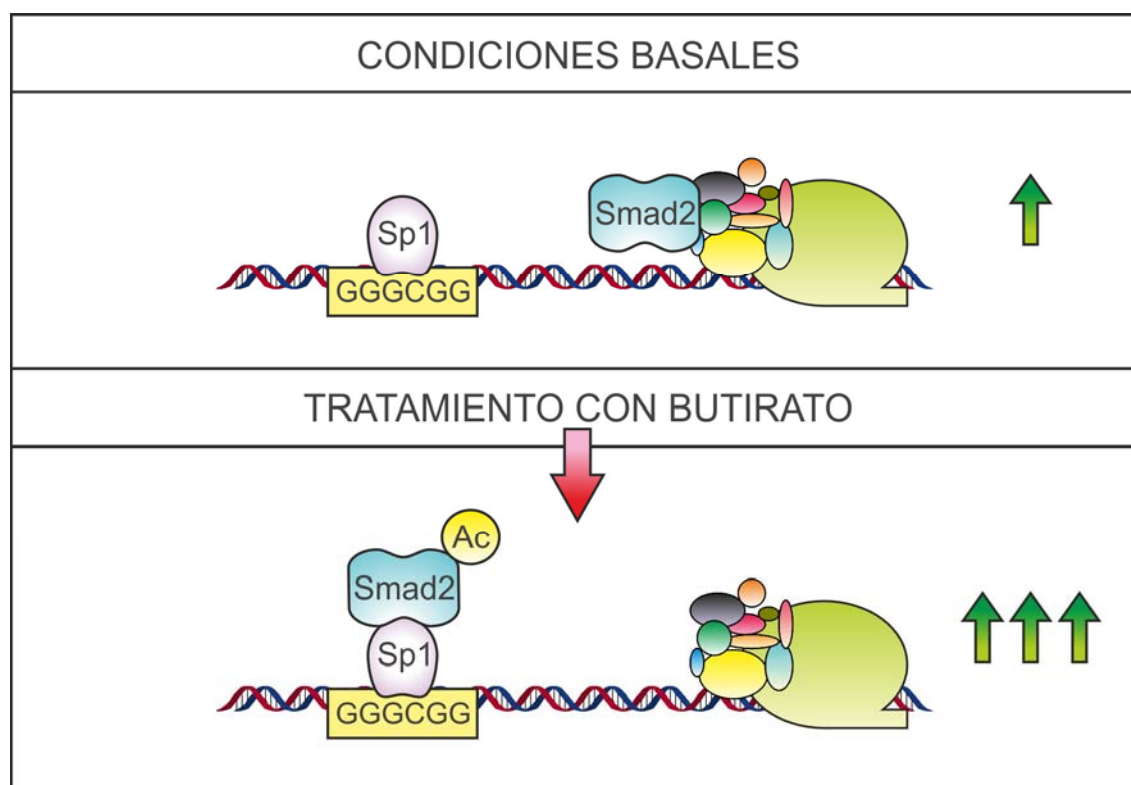


Figura 17. Modelo de regulación del gen de la *MMP-11*.

El factor de transcripción Sp1 es fundamental para la actividad basal del promotor *MMP-11*. Este interacciona a través de varias cajas GC presentes en una región próxima al punto +1 de inicio de la transcripción. Por otra parte, Smad2 también se encuentra unido al promotor, probablemente interaccionando con el complejo basal de la transcripción. El tratamiento con butirato induce la acetilación de Smad2, de forma que se promueve la formación de complejos Sp1/Smad2, que interaccionan con el promotor *MMP-11* a través de las cajas GC e incrementan significativamente su actividad transcripcional.

que promueve la formación de complejos con Sp1 y un incremento en la actividad transcripcional. En cuanto al significado biológico del incremento en la expresión de esta proteína por butirato, podría relacionarse con una señal de supervivencia frente a los efectos apoptóticos del butirato, ya que se ha descrito que los dominios hemopexina de varias MMP pueden inducir señales de supervivencia por interacción con receptores de membrana.

También se ha analizado la regulación del promotor de la *MMP-11* en las células BCS-TC2.BR2. En este caso los niveles de esta proteína en medios condicionados prácticamente no se alteran tras el tratamiento con inhibidores de HDAC. Los ensayos de luciferasa dual con diferentes construcciones del promotor arrojan resultados muy similares para la regulación de la transcripción basal a los obtenidos en células BCS-TC2, siendo fundamental la región proximal del promotor y existiendo elementos

represores distales como AP1. Las diferencias más significativas se observan tras el tratamiento con butirato y TSA, ya que la activación transcripcional se duplica con las dos construcciones de mayor tamaño respecto a las células sensibles. Esto puede indicar la existencia de elementos distales de respuesta a butirato que sólo son activos en las células resistentes. Un análisis de predicción de sitios de unión ha permitido detectar la existencia de dos potenciales sitios p53 en las posiciones -640 y -1320. Ensayos de *ChIP* han confirmado que p53 interacciona con el promotor de la MMP-11 en células BCS-TC2 a través de la secuencia localizada en la posición -640, aunque no se han observado cambios significativos en esta interacción tras el tratamiento con butirato. En cualquier caso, es necesario un análisis más profundo de la regulación de este gen en células resistentes. Además, dado que la mayor activación transcripcional por butirato respecto a las células sensibles no se correlaciona con un incremento en los niveles de proteína, deben existir mecanismos postraduccionales adicionales que regulen su expresión.

Finalmente, también se ha abordado el análisis del promotor de la isoforma β -MMP-11. Esta isoforma fue descrita por Luo y col. en 2002 como una proteína intracelular y constitutivamente activa debido a la ausencia tanto del péptido señal como del propéptido que aparecen en la isoforma clásica o α -MMP-11 (Luo y col., 2002). En nuestro sistema celular hemos detectado el mRNA por RT-PCR cuantitativa, pero no hemos detectado la presencia de esta proteína ni en extractos celulares ni en medios condicionados, lo que podría relacionarse con bajos niveles de expresión o estabilidad reducida de la proteína. En este sentido, se ha comprobado que el tratamiento con butirato y TSA incrementa la transcripción de esta isoforma, siendo el efecto mayor en el caso del TSA. Con el fin de estudiar la regulación de su promotor se emplearon tres construcciones diferentes en ensayos de luciferasa. En relación a la transcripción basal, las regiones más importantes se localizan en la zona proximal del promotor, comprendiendo las 60 primeras bases desde el punto de inicio de la transcripción. Al igual que en el caso de la isoforma clásica, existen elementos represores distales entre los que se encuentra AP1. Por otra parte, parece existir algún elemento activador al cual sólo responden las células sensibles, como se observa en los resultados obtenidos con la construcción de 0,5-ST3.

El tratamiento con butirato y TSA induce la activación transcripcional en ambos tipos de células, siendo este efecto prácticamente el doble en las células sensibles y siempre más acusado en el caso del butirato respecto al TSA. Además, la respuesta a

estos agentes es mayor a medida que se emplean construcciones más extensas del promotor. Dada la intensa respuesta observada a estos agentes con la construcción de menor tamaño, se ha empleado su secuencia para un análisis de predicción de potenciales sitios de unión de factores de transcripción. De todos los elementos potenciales de respuesta, sólo MAZ aparece en común respecto a la predicción de la isoforma clásica. En cualquier caso se diseñaron diferentes sondas para ensayos de retardo en gel, empleándose los mismos anticuerpos que en los estudios de la isoforma clásica. De forma similar a lo observado en esta última, no se detectó unión de MAZ, ZBP-89 ni Sp3, pero sí de Sp1 en la sonda 0,06-ST3-a donde hay un sitio de unión para MAZ. Dado que estas secuencias son ricas en citosinas y guaninas, cabe la posibilidad de que Sp1 interaccione con estas regiones del promotor de manera inespecífica, aunque se requiere realizar un análisis más exhaustivo para comprender estos mecanismos de regulación.

6. CONCLUSIONES

1. Bile acids (mainly CDCA) induce apoptosis by oxidative stress in human colon adenocarcinoma BCS-TC2 cells, which are sensitive to differentiation and apoptosis induced by butyrate. Activation of different membrane-associated enzymes [NAD(P)H oxidases and PLA₂] promotes an increase of reactive oxygen species that eventually triggers the mitochondrial apoptotic pathway. The activation of caspase-3 by the apoptosome leads to the cleavage of Bcl-2, thus releasing Bax and allowing the formation of additional pores in the mitochondrial membrane and generating a feedback loop that amplifies the apoptotic signal.
2. Butyrate-resistant BCS-TC2.BR2 cells are less sensitive to the apoptotic effects of bile acids. Although the molecular mechanisms triggered by these agents are similar to those observed in BCS-TC2 cells, BCS-TC2.BR2 cells show enhanced resistance to bile acid-induced apoptosis due to an overexpression of Bcl-2 that impairs the formation of Bax-dependent pores in the mitochondrial membrane. This is confirmed by the fact that this resistance can be reverted *in vitro* by the use of the Bcl-2 inhibitor ABT-263.
3. Butyrate treatment is able to alter the gene expression profile of BCS-TC2 cells, significantly modifying around 178 genes. The growth of cells under multicellular spheroids impairs the accessibility of butyrate, thus promoting resistance to this agent.
4. Annexin A1 promoter activity is controlled by a functional cooperation between p53 and factors binding to the proximal CCAAT box. Transcription is induced by butyrate treatment, and is mediated through a release of NF-Y from the proximal CCAAT box and an enhancement of p53 binding which is dependent on p38 MAPK activation. The interaction of p53 with the promoter is dependent on p38 MAPK activity either in the absence or in the presence of butyrate. Further, activation of p38 MAPK by this agent is required to increase annexin A1 promoter activity and to increase protein expression.
5. The N-terminus of annexin A5 plays a key role in vesicle aggregation via formation of protein dimers through their concave exposed surface.

6. The expression of MMP-11 in epithelial human colon adenocarcinoma cells has been detected for the first time. In BCS-TC2 cells, Sp1 binding to the GC-rich region in the proximal promoter of MMP11 is necessary for transcription via binding of a protein heterocomplex that involves Smad2. Butyrate treatment increases the acetylation status of Smad2 favoring the association Sp1/Smad2 with a subsequent increase in the transcriptional activity and MMP-11 protein levels. Whereas the activation of the ERK signaling pathway is not required for MMP-11 basal expression, it is quite important for the upregulation of the expression of this gene by HDAC inhibitors.

7. ANEXO I

MODELOS DE CÁNCER COLORRECTAL

La carcinogénesis colorrectal es un proceso multisecencial. Independientemente de los factores hereditarios, la aparición de mutaciones somáticas, debido a errores en la replicación del DNA o como consecuencia de la exposición a carcinógenos, puede provocar la expansión clonal de un grupo de células con el material genético alterado. En 1990 Fearon y Vogelstein propusieron un modelo de carcinogénesis que describe la posible secuencia de alteraciones genéticas con base en las modificaciones moleculares observadas en el DNA (Fearon y Vogelstein, 1990). Este proceso comenzaría con la inactivación del gen supresor de tumores *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), seguido por mutaciones en *KRAS* que promueven su activación constitutiva. A estas alteraciones iniciales se sumarían subsiguientes mutaciones adicionales en *TGF- β* o *TP53*, de modo que se predice que son necesarias al menos siete mutaciones para generar un fenotipo maligno.

Desde aquel trabajo pionero, que estableció las bases del modelo de la “ruta clásica” de carcinogénesis colorectal (la secuencia adenoma-carcinoma), se han llevado a cabo grandes avances en el estudio de los mecanismos y vías celulares que participan en el proceso de tumorigénesis (Figura Anexo 1A). Así, actualmente se ha calculado que podrían existir hasta 80 genes mutados por cada tumor colorrectal, si bien sólo un pequeño grupo de ellos (alrededor de 15) puede considerarse como el auténtico responsable del proceso tumorigénico (Wood y col., 2007; Leary y col., 2008). De este modo, se han propuesto cuatro rutas o modelos de carcinogénesis colorrectal: la ruta de inestabilidad cromosómica (CIN; *Chromosomal Instability Pathway*), el fenotipo hipermetilador de islas CpG (CIMP; *CpG Island Methylator Phenotype*), la ruta de inestabilidad de microsatélites (MSI; *Microsatellite Instability Pathway*) y la recientemente descrita ruta del adenoma dentado o aserrado (*Serrated Pathway*) (Harrison y Benziger, 2011). Estas se distinguen por la predominancia de ciertas alteraciones genéticas o epigenéticas específicas de cada una de ellas, así como por sus diferentes características patológicas y de pronóstico. Un esquema de las mutaciones implicadas en la progresión adenoma-carcinoma se recoge en la Figura Anexo 1B.

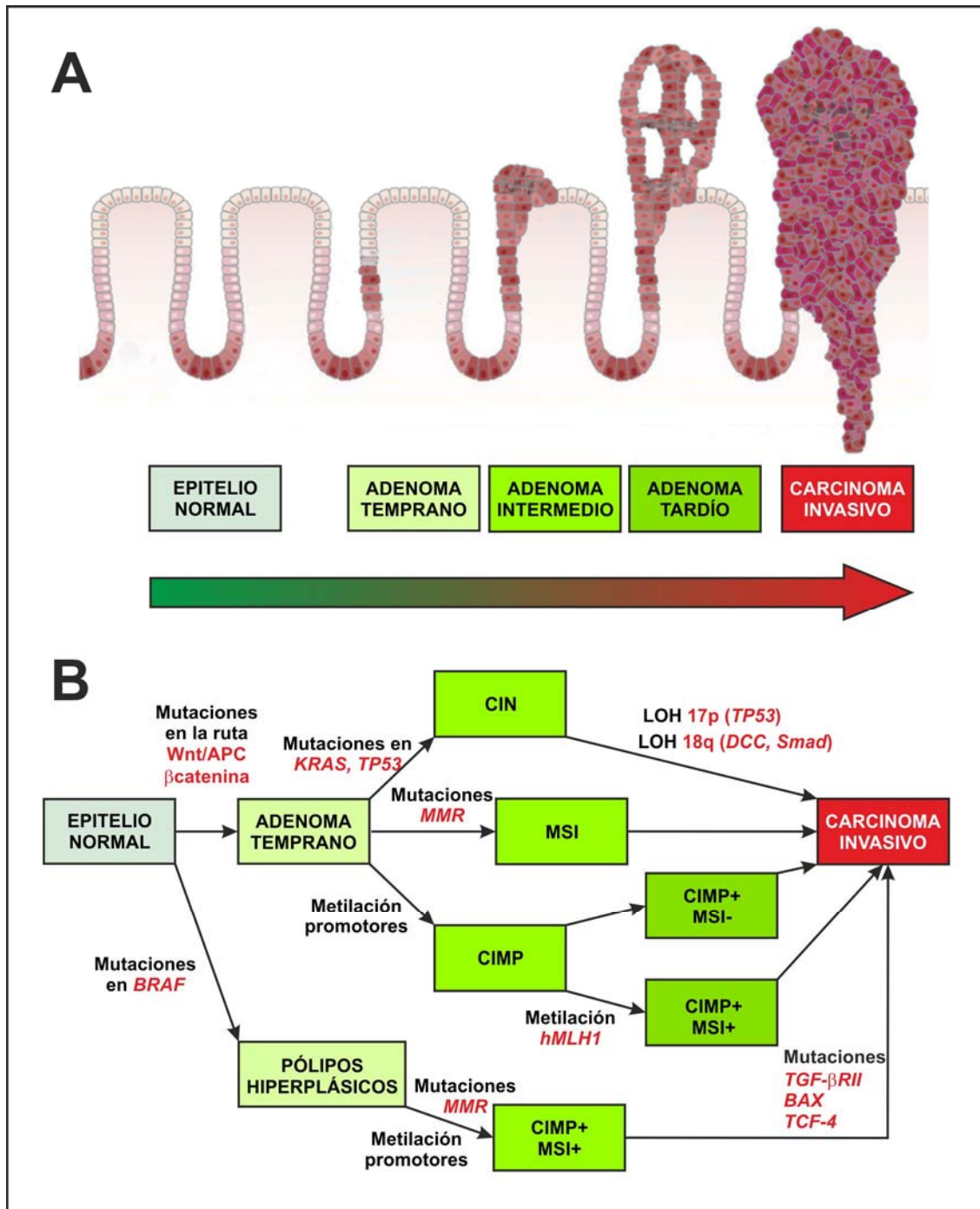


Figura Anexo 1. Tumorigénesis colorrectal. Progresión adenoma-carcinoma.

En la parte superior (A) se representan los diferentes estadios propuestos durante el proceso de tumorigénesis colorrectal. En la parte inferior (B) se indica de forma esquemática algunas de las mutaciones implicadas en la adquisición de los diferentes fenotipos tumorigénicos asociados con la progresión adenoma-carcinoma (CIMP: fenotipo hipermetilador de islas CpG; CIN: inestabilidad cromosómica; LOH: pérdida de heterocigosis; MSI: inestabilidad de microsatélites).

Inestabilidad cromosómica

La inestabilidad cromosómica es el tipo de alteración genómica más observada en tumores colorrectales, habiéndose identificado en casi el 85% de los casos (Grady y Carethers, 2008). Se considera la mayor fuente de inestabilidad genética y, por tanto, el principal responsable de la acumulación rápida y eficiente de mutaciones cancerosas. Estos tumores se caracterizan por alteraciones cromosómicas que incluyen tanto reordenamientos como deleciones de grandes regiones, e incluso de cromosomas completos. Este fenotipo podría ser consecuencia de defectos en las rutas implicadas en la correcta segregación cromosómica durante la mitosis. En este sentido se ha identificado la mutación del gen *hBUB1* (*human budding uninhibited by benzimidazole*) como una de las responsables de errores en el punto de control para la formación del huso mitótico (Cahill y col., 1998). Otra anomalía cromosómica precursora de CIN deriva de un número anormal de centrosomas, o bien de un mal funcionamiento de los mismos. Un grupo de proteínas estrechamente asociadas con estos procesos son las aurora quinasas; la sobreexpresión de la aurora quinasa A se ha relacionado con amplificación de centrosomas, habiéndose correlacionado con el grado de CIN en diferentes tumores colorrectales (Ewart-Toland y col., 2003). Por otro lado, aunque no se conocen exactamente los mecanismos a través de los cuales actúa en el proceso tumorigénico, la sobreexpresión de aurora quinasa B también se ha relacionado con estados avanzados de cáncer colorrectal (Katayama y col., 1999). Finalmente, otro posible origen de CIN radica en el mal funcionamiento de los telómeros, ya que se generan fusiones de los extremos de varios cromosomas dando lugar a una profunda reorganización genómica. Curiosamente, mientras que se ha detectado un acortamiento de los telómeros (70-90%) en muestras de cáncer de colon respecto a los tejidos adyacentes, también se ha observado una actividad telomerasa incrementada en dichos tumores. La hipótesis más aceptada es que, mientras que el acortamiento de los telómeros promueve la inestabilidad cromosómica durante las primeras fases del proceso tumorigénico, la activación de la telomerasa en etapas más avanzadas confiere la inmortalidad a las células tumorales (Pino y Chung, 2010).

En cualquier caso, e independientemente del mecanismo a través del cual se generen estos cariotipos anómalos, parecen existir una serie de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores específicos, asociadas con procesos de tumorigénesis colorrectal por inestabilidad cromosómica. Así, la ruta de CIN se caracteriza por: mutaciones en el gen *APC* o pérdida completa de este gen por deleción

del cromosoma 5; mutaciones en *KRAS*; delección del brazo corto del cromosoma 18, que contiene los genes *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer*), *Smad2* y *Smad4*; y delección del brazo largo del cromosoma 17, donde se localiza el gen *TP53* (Worthley y col., 2007; Migliore y col., 2011). Si bien todas estas alteraciones genéticas son importantes para la aparición de un fenotipo tumorigénico, el paso inicial en la mayoría de los carcinomas colorrectales parece ser la mutación del gen supresor de tumores *APC*, localizado en el cromosoma 5q21. Este gen codifica una proteína de ~300 kDa que forma homooligómeros y se asocia con cateninas. Las mutaciones somáticas de este gen aparecen en la mayoría de los tumores de colon, mientras que sus alteraciones en la línea germinal son responsables de la poliposis adenomatosa familiar (FAP, *Familial Adenomatous Polyposis*). Entre sus funciones se encuentra la regulación de la ruta de señalización de Wnt, la regulación de la adhesión celular a través de β -catenina y E-cadherina, la regulación de la migración celular a través de la interacción con microtúbulos, y el bloqueo del ciclo celular (Aoki y Taketo, 2007).

Uno de los papeles principales de APC es funcionar como proteína de andamiaje en el complejo regulador de la ruta de señalización Wnt, que controla los niveles de β -catenina. En ausencia de señales de activación, la β -catenina se mantiene en el citosol formando complejos con las proteínas APC, axina y glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β). Los niveles de β -catenina se mantienen bajos a través de fosforilación por serina/treonina quinasas, principalmente GSK-3 β y caseína quinasas, generándose sitios de reconocimiento para ubiquitina-ligasas que conducen a la degradación de la β -catenina a través del proteasoma. Las señales de activación de la ruta Wnt activan a la proteína Dsh (*Dishevelled*) que, a su vez, inhibe a GSK-3 β , de modo que disminuye la degradación de β -catenina y conduce a su acumulación en el citosol. La mayor disponibilidad de β -catenina en la célula provoca su translocación al núcleo, donde se une a los factores TCF/LEF alterando la expresión de una batería de genes relacionados con el estado de proliferación y diferenciación celular, como *c-myc* o *CCND3* (Pinto y Clevers, 2005). Esto supone que las mutaciones en *APC* provocan alteraciones en el complejo con la β -catenina, axina y GSK-3 β , de manera que disminuye la degradación de β -catenina y, por tanto, se produce una activación constitutiva de la ruta Wnt.

APC también ejerce funciones importantes a través de sus interacciones con el citoesqueleto, por lo que mutaciones en *APC* se han relacionado con alteraciones en la migración celular y en la correcta segregación cromosómica durante la mitosis (Kroboth y col., 2007). Estas mutaciones generan cambios en la regulación del citoesqueleto

afectando a microtúbulos y F-actina, lo que se traduce en alteraciones en la migración y adhesión celular. Esto provoca que las células puedan permanecer demasiado tiempo en presencia de agentes carcinogénicos incrementándose la probabilidad de que ocurra su transformación maligna (Nathke, 2004). La desregulación del citoesqueleto también se traduce en defectos en la formación del huso mitótico, lo que puede contribuir a generar inestabilidad genética y dar lugar a fenómenos de aneuploidía. Estos procesos de transformación maligna, asociados a un estado aumentado de la proliferación celular debido a la pérdida de regulación de la ruta Wnt, generan un ambiente celular idóneo para la formación del tumor colorrectal (Sansom y col., 2004).

Otro de los genes alterados en la ruta CIN es el oncogen *KRAS*. Este gen, localizado en el cromosoma 12, codifica una proteína G (K-Ras) implicada en el proceso de transducción de la señal desde el exterior celular al interior del núcleo. Se ha detectado la mutación de *KRAS* en más del 50% de tumores esporádicos de colon, y parece ser responsable de la iniciación de tumores colorrectales en sujetos con criptas aberrantes (*ACF*; *Aberrant Crypt Foci*) (Pretlow y Pretlow, 2005). Estas mutaciones impiden la correcta hidrólisis del GTP y provocan una activación constitutiva de la proteína, lo que se traduce en la desregulación de numerosas rutas que controlan procesos biológicos fundamentales como proliferación, apoptosis y motilidad celular. Una de las características principales de las células transformadas por mutaciones en *KRAS* es el remodelado del citoesqueleto de actina a través de los efectores Raf-quinasa y PI3-quinasa. Estas alteraciones provocan baja adhesión, motilidad e invasividad incrementada, y crecimiento independiente de inhibición por contacto (Pollock y col., 2005). La proteína K-Ras también está en contacto con la ruta Wnt, siendo capaz de incrementar la estabilidad y los niveles en el núcleo de la β -catenina a través de la inhibición de GSK-3 β (Li y col., 2005).

Como se ha señalado anteriormente, los cromosomas 18q y 17p se encuentran habitualmente afectados por pérdidas alélicas en tumores de colon. En la región 18q21 se localiza el gen supresor de tumores *DCC*. Este gen codifica una proteína que presenta gran homología con NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*). Su mutación afecta a los mecanismos de interacción célula-célula y célula-matriz extracelular (Aschele y col., 2004). Otra de las familias de proteínas alteradas en los tumores colorrectales originados por CIN es la del TGF- β . Estas citoquinas regulan diferentes procesos biológicos, como diferenciación, proliferación, apoptosis o formación de la matriz extracelular, y en su mecanismo de señalización participan proteínas de la familia Smad

(*Small Mother Against Decapentaplegic*) (Lampropoulos y col., 2012). El epitelio colónico normal expresa tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1, 2 y 3), actuando en una ruta supresora de tumores, de modo que inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis. Sin embargo, durante estadios avanzados de la carcinogénesis colorrectal TGF- β actúa como promotor de tumores y sus niveles se encuentran incrementados (Mishra y col., 2005). Se ha demostrado que TGF- β estimula la proliferación de células de cáncer de colon poco diferenciadas promoviendo la transformación maligna y la progresión del tumor (Li y col., 2005). La proteína Smad4 se localiza en una región del cromosoma 18q que generalmente desaparece en la ruta CIN. Esta proteína está implicada en la regulación de NF- κ B a través de TGF- β como coactivador transcripcional, y se ha puesto de manifiesto su papel como gen supresor de la progresión de tumores de colon (Grau y col., 2006).

El cromosoma 17p sufre pérdidas alélicas en más del 75% de los tumores colorrectales, localizándose en esta región cromosómica el gen supresor de tumores *TP53* (p53) (Pino y Chung, 2010). El papel de este factor de transcripción, en condiciones normales, es el de frenar el ciclo celular en fase G1 para facilitar la reparación del DNA, o bien para inducir apoptosis cuando el daño en el DNA es irreparable (Meek, 2009). En general p53 protege al organismo frente a transformaciones neoplásicas actuando como un sensor de señales de proliferación excesivas y eliminando las células anormales por apoptosis. Responde a numerosas señales de estrés como daño en el DNA, hipoxia o baja disponibilidad de nutrientes. Uno de sus principales papeles es el de activar la expresión del inhibidor del ciclo celular *p21^{Waf1}*, y regula numerosos genes entre los que se incluyen miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 y los receptores de muerte Fas y DR5 (Zilfou y Lowe, 2009).

De forma resumida, se ha propuesto una secuencia de carcinogénesis colorrectal por inestabilidad cromosómica según la cual el primer evento sería la mutación del gen *APC*, lo que promueve la aparición de focos de criptas aberrantes. La progresión hacia adenoma requiere mutaciones en *KRAS*, mientras que mutaciones en *TP53* y pérdida de heterocigosis en el cromosoma 18q conducen a estadios de adenoma tardío e incluso con características invasivas. Todo este proceso de progresión tumoral va acompañado de un incremento progresivo y paralelo de CIN (Pino y Chung, 2010).

Inestabilidad de microsatélites

La pérdida de estabilidad genética juega un papel fundamental en las etapas tempranas de la tumorigénesis, puesto que da lugar a un ambiente permisivo para la generación de alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores. En este sentido, existe otro modelo de carcinogénesis colorrectal que implica inestabilidad de microsatélites y surge como consecuencia de la inactivación del sistema MMR (*Mutation Mismatch Repair*) de reparación de errores del DNA. Este sistema está formado por un complejo de proteínas que reconoce y repara mutaciones puntuales de un par de bases generadas durante el proceso de replicación. Entre los genes alterados de este sistema se encuentran *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* y *PMS2* (Vilar y Gruber, 2010). Aproximadamente el 15% de todos los tumores colorrectales presentan MSI (de estos, el 75-80% ha adquirido metilación en el gen *MLH1*), y sólo un 2-3% de todos los tumores de colon presentan mutaciones de cualquiera de estos genes del sistema MMR en la línea germinal (Boland y Goel, 2010). Además, esta alteración es característica de pacientes con el Síndrome de Lynch, un síndrome familiar no asociado a poliposis (HNPCC, *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*), que incrementa el riesgo de desarrollar tumores de colon y extracolónicos. Entre los genes que aparecen mutados más frecuentemente en casos de inestabilidad de microsatélites se encuentra el gen del receptor de tipo II de TGF- β (*TGF β RII*) y de modo menos frecuente, los genes del receptor de activina tipo II (*ACTRII*), *BAX*, *APAF-1*, *CASP5*, *MSH6*, *RIZ* o *PTEN* (Iacopetta y col., 2010). Todos ellos están relacionados con mecanismos de control de ciclo celular, proliferación y apoptosis, de modo que las mutaciones que se adquieren por MSI generan una combinación idónea para el proceso tumorigénico.

Fenotipo hipermetilador de islas CpG

Otra de las rutas de carcinogénesis colorrectal bien caracterizadas es la derivada de alteraciones epigenéticas que afectan a la metilación de diferentes promotores y que dan lugar a lo que se conoce como fenotipo hipermetilador de islas CpG. Comparado con tejidos normales, las células de cáncer colorrectal presentan una cromatina hipometilada de forma global, pero que aparece hipermetilada regionalmente en islas CpG (Frigola y col., 2005). Estas islas se localizan en un gran número de promotores y, en condiciones normales, no se encuentran metiladas, mientras que su hipermetilación durante el proceso carcinogénico se ha descrito como un mecanismo de silenciamiento de genes supresores de tumores, como *APC*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *RARB2* o *RASSF1A*

(Carmona y Esteller, 2010; Migliore y col., 2011). Se han propuesto dos mecanismos para explicar la inactivación de la expresión génica por metilación de islas CpG. Uno de ellos es la inhibición directa de la interacción entre promotores metilados y factores de transcripción (como en el caso de CREB, AP-2, E2F o c-Myc), mientras que el otro implica la unión de proteínas represoras de la transcripción al DNA metilado (Kondo y Issa, 2004).

El aumento en la frecuencia de genes metilados de forma aberrante se correlaciona con la progresión del tumor, pudiendo observarse frecuencias de metilación significativamente diferentes de genes específicos entre adenomas tempranos, adenomas avanzados y adenocarcinomas (Carmona y Esteller, 2010; Kim y col., 2010). Si bien es cierto que diversos estudios ponen de manifiesto la hipermetilación de varios genes con la edad, se ha propuesto que esta metilación asociada a la edad puede dar lugar de forma potencial a estados hiperproliferativos que preceden a la formación de un tumor (Grady, 2005). En el fenotipo CIMP se observa un patrón de metilación aberrante en varios genes simultáneamente. Estos estados anómalos de metilación parecen ser consecuencia tanto de un aumento en la actividad enzimática de las DNA metiltransferasas, como de una selección errónea de sus dianas (Teodoridis y col., 2008). Además, como ya se ha mencionado, uno de los promotores que se encuentra generalmente hipermetilado en pacientes con fenotipo CIMP es el del gen *hMLH1*, que pertenece al sistema MMR de reparación de daño en el DNA. Esto supone que el fenotipo metilador se encuentra íntimamente asociado, a su vez, con el fenotipo MSI, puesto que se induce inestabilidad de microsatélites (Boland y Goel, 2010).

Carcinoma dentado o aserrado

Un modelo de carcinogénesis colorrectal recientemente descrito es el del carcinoma dentado o aserrado. Antes se aceptaba que los pólipos colorrectales eran de dos tipos: adenomas y pólipos hiperplásicos. Mientras que los pólipos hiperplásicos se consideran benignos, los adenomas son precursores de cáncer colorrectal. Pero, actualmente, se ha descrito que estos pólipos hiperplásicos engloban un grupo heterogéneo de lesiones que se clasifican como adenomas dentados tradicionales (TSA, *Traditional Serrated Adenomas*), adenomas dentados sésiles (SSA, *Sessile Serrated Adenomas*), y auténticos pólipos hiperplásicos (Harvey y Ruzskiewicz, 2007; Tannapfel y col., 2010). Se ha propuesto un modelo de carcinogénesis colorrectal a partir de los

adenomas dentados donde el primer evento parece ser la mutación del gen *BRAF* que confiere actividad constitutiva a la serina/treonina quinasa que codifica. Las lesiones generadas tras este primer paso son especialmente susceptibles de adquirir un fenotipo CIMP, de modo que se produce el consiguiente silenciamiento de varios genes supresores de tumores favoreciendo el proceso carcinogénico. Además, uno de los genes que se encuentra generalmente metilado en estos adenomas dentados es el *hMLH1*, lo que conduce a su vez a un incremento en la inestabilidad de microsatélites (Snover, 2011).

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad A., Hanby A., Dublin E., Poulson R., Smith P., Barnes D., Rubens R., Anglard P., y Hart I. Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. *Am J Pathol* 1998; **152**: 721-8.
- Ahmed F. E. Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2004; **22**: 91-147.
- Akare S., y Martinez J. D. Bile acid induces hydrophobicity-dependent membrane alterations. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1735**: 59-67.
- Alldrige L. C., y Bryant C. E. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. *Exp Cell Res* 2003; **290**: 93-107.
- Amano T., Kwak O., Fu L., Marshak A., y Shi Y. B. The matrix metalloproteinase stromelysin-3 cleaves laminin receptor at two distinct sites between the transmembrane domain and laminin binding sequence within the extracellular domain. *Cell Res* 2005; **15**: 150-9.
- Anglard P., Melot T., Guerin E., Thomas G., y Basset P. Structure and promoter characterization of the human stromelysin-3 gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 20337-44.
- Aoki K., y Taketo M. M. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* 2007; **120**: 3327-35.
- Araki Y., Katoh T., Ogawa A., Bamba S., Andoh A., Koyama S., Fujiyama Y., y Bamba T. Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radic Biol Med* 2005; **39**: 769-80.
- Aschele C., Debernardis D., Lonardi S., Bandelloni R., Casazza S., Monfardini S., y Gallo L. Deleted in colon cancer protein expression in colorectal cancer metastases: a major predictor of survival in patients with unresectable metastatic disease receiving palliative fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 3758-65.
- Ayala-Sanmartin J., Gouache P., y Henry J. P. N-Terminal domain of annexin 2 regulates Ca(2+)-dependent membrane aggregation by the core domain: a site directed mutagenesis study. *Biochemistry* 2000; **39**: 15190-8.
- Azcarate-Peril M. A., Sikes M., y Bruno-Barcena J. M. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; **301**: G401-24.
- Bach Knudsen K. E., Serena A., Canibe N., y Juntunen K. S. New insight into butyrate metabolism. *Proc Nutr Soc* 2003; **62**: 81-6.
- Bai L., Kao J. Y., Law D. J., y Merchant J. L. Recruitment of ataxia-telangiectasia mutated to the p21(waf1) promoter by ZBP-89 plays a role in mucosal protection. *Gastroenterology* 2006; **131**: 841-52.
- Bai L., y Merchant J. L. Transcription factor ZBP-89 cooperates with histone acetyltransferase p300 during butyrate activation of p21waf1 transcription in human cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 30725-33.
- Bai L., y Merchant J. L. ZBP-89 promotes growth arrest through stabilization of p53. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 4670-83.
- Bai X. F., Ni X. G., Zhao P., Liu S. M., Wang H. X., Guo B., Zhou L. P., Liu F., Zhang J. S., Wang K., Xie Y. Q., Shao Y. F., y Zhao X. H. Overexpression of annexin

- 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 1466-70.
- Bandorowicz-Pikula J., Kirilenko A., van Deursen R., Golczak M., Kuhnel M., Lancelin J. M., Pikula S., y Buchet R. A putative consensus sequence for the nucleotide-binding site of annexin A6. *Biochemistry* 2003; **42**: 9137-46.
- Basset P., Bellocq J. P., Wolf C., Stoll I., Hutin P., Limacher J. M., Podhajcer O. L., Chenard M. P., Rio M. C., y Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; **348**: 699-704.
- Bedrood S., Jayasinghe S., Sieburth D., Chen M., Erbel S., Butler P. C., Langen R., y Ritzel R. A. Annexin A5 directly interacts with amyloidogenic proteins and reduces their toxicity. *Biochemistry* 2009; **48**: 10568-76.
- Begley M., Gahan C. G., y Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 2005; **29**: 625-51.
- Benatti P., Basile V., Merico D., Fantoni L. I., Tagliafico E., y Imbriano C. A balance between NF- κ B and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**: 1415-28.
- Bernstein C., Holubec H., Bhattacharyya A. K., Nguyen H., Payne C. M., Zaitlin B., y Bernstein H. Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Arch Toxicol* 2011; **85**: 863-71.
- Bernstein H., Bernstein C., Payne C. M., Dvorakova K., y Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res* 2005; **589**: 47-65.
- Bernstein H., Payne C. M., Kunke K., Crowley-Weber C. L., Waltmire C. N., Dvorakova K., Holubec H., Bernstein C., Vaillancourt R. R., Raynes D. A., Guerriero V., y Garewal H. A proteomic study of resistance to deoxycholate-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 2004; **25**: 681-92.
- Bertrand P. Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010; **45**: 2095-116.
- Bhardwaj A., y Aggarwal B. B. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 2003; **23**: 317-32.
- Blottiere H. M., Buecher B., Galmiche J. P., y Cherbut C. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* 2003; **62**: 101-6.
- Boersma H. H., Kietselaer B. L., Stolk L. M., Bennaghmouch A., Hofstra L., Narula J., Heidendal G. A., y Reutelingsperger C. P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 2005; **46**: 2035-50.
- Bohan C. A., Robinson R. A., Luciw P. A., y Srinivasan A. Mutational analysis of sodium butyrate inducible elements in the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat. *Virology* 1989; **172**: 573-83.
- Boland C. R., y Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; **138**: 2073-87 e3.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-54.
- Brady C. A., y Attardi L. D. p53 at a glance. *J Cell Sci* 2010; **123**: 2527-32.
- Brew K., y Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1803**: 55-71.
- Buckland A. G., y Wilton D. C. Inhibition of human cytosolic phospholipase A2 by human annexin V. *Biochem J* 1998; **329** (Pt 2): 369-72.

- Butler L. M., Wang R., Koh W. P., Stern M. C., Yuan J. M., y Yu M. C. Marine n-3 and saturated fatty acids in relation to risk of colorectal cancer in Singapore Chinese: a prospective study. *Int J Cancer* 2009; **124**: 678-86.
- Cahill D. P., Lengauer C., Yu J., Riggins G. J., Willson J. K., Markowitz S. D., Kinzler K. W., y Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998; **392**: 300-3.
- Canaider S., Solito E., de Coupade C., Flower R. J., Russo-Marie F., Goulding N. J., y Perretti M. Increased apoptosis in U937 cells over-expressing lipocortin 1 (annexin I). *Life Sci* 2000; **66**: PL265-70.
- Caohuy H., y Pollard H. B. Annexin 7: a non-SNARE proteolytic substrate for botulinum toxin type C in secreting chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **971**: 287-90.
- Carmona F. J., y Esteller M. Epigenomics of human colon cancer. *Mutat Res* 2010; **693**: 53-60.
- Cederholm A., y Frostegard J. Annexin A5 in cardiovascular disease and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* 2005; **210**: 761-8.
- Clark I. M., Swingle T. E., Sampieri C. L., y Edwards D. R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; **40**: 1362-78.
- Clayton P. T. Disorders of bile acid synthesis. *J Inherit Metab Dis* 2011; **34**: 593-604.
- Clifton J. G., Brown M. K., Huang F., Li X., Reutter W., Hofmann W., Hixson D. C., y Josic D. Identification of members of the annexin family in the detergent-insoluble fraction of rat Morris hepatoma plasma membranes. *J Chromatogr A* 2006; **1123**: 205-11.
- Cocco T., Di Paola M., Papa S., y Lorusso M. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**: 51-9.
- Cohen H. Y., Lavu S., Bitterman K. J., Hekking B., Imahiyerobo T. A., Miller C., Frye R., Ploegh H., Kessler B. M., y Sinclair D. A. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2004; **13**: 627-38.
- Comalada M., Bailon E., de Haro O., Lara-Villoslada F., Xaus J., Zarzuelo A., y Galvez J. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; **132**: 487-97.
- Cornely R., Rentero C., Enrich C., Grewal T., y Gaus K. Annexin A6 is an organizer of membrane microdomains to regulate receptor localization and signalling. *IUBMB Life* 2011; **63**: 1009-17.
- Cress W. D., y Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 2000; **184**: 1-16.
- Crowley-Weber C. L., Payne C. M., Gleason-Guzman M., Watts G. S., Futscher B., Waltmire C. N., Crowley C., Dvorakova K., Bernstein C., Craven M., Garewal H., y Bernstein H. Development and molecular characterization of HCT-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate. *Carcinogenesis* 2002; **23**: 2063-80.
- Croxtall J. D., Choudhury Q., y Flower R. J. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 2000; **130**: 289-98.

- Cubells L., Vila de Muga S., Tebar F., Bonventre J. V., Balsinde J., Pol A., Grewal T., y Enrich C. Annexin A6-induced inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 is linked to caveolin-1 export from the Golgi. *J Biol Chem* 2008; **283**: 10174-83.
- Cubells L., Vila de Muga S., Tebar F., Wood P., Evans R., Ingelmo-Torres M., Calvo M., Gaus K., Pol A., Grewal T., y Enrich C. Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex. *Traffic* 2007; **8**: 1568-89.
- Chakraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A., y Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003; **253**: 269-85.
- Charney A. N., Micic L., y Egnor R. W. Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon. *Am J Physiol* 1998; **274**: G518-24.
- Chasserot-Golaz S., Vitale N., Sagot I., Delouche B., Dirrig S., Pradel L. A., Henry J. P., Aunis D., y Bader M. F. Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol* 1996; **133**: 1217-36.
- Chasserot-Golaz S., Vitale N., Umbrecht-Jenck E., Knight D., Gerke V., y Bader M. F. Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 1108-19.
- Cheadle C., Cho-Chung Y. S., Becker K. G., y Vawter M. P. Application of z-score transformation to Affymetrix data. *Appl Bioinformatics* 2003; **2**: 209-17.
- Chen Y. J., Chang W. M., Liu Y. W., Lee C. Y., Jang Y. H., Kuo C. D., y Liao H. F. A small-molecule metastasis inhibitor, norcantharidin, downregulates matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting Sp1 transcriptional activity in colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact* 2009; **181**: 440-6.
- Cheng K., y Raufman J. P. Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. *Biochem Pharmacol* 2005; **70**: 1035-47.
- Chiang J. Y. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 2009; **50**: 1955-66.
- Chipuk J. E., Moldoveanu T., Llambi F., Parsons M. J., y Green D. R. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010; **37**: 299-310.
- Chowdhury I., Tharakan B., y Bhat G. K. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett* 2006; **11**: 506-25.
- D'Acquisto F., Perretti M., y Flower R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol* 2008; **155**: 152-69.
- Dai C., y Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* 2010; **16**: 528-36.
- Davie J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 2003; **133**: 2485S-93S.
- Davis C. D., y Milner J. A. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem* 2009; **20**: 743-52.
- De Gottardi A., Touri F., Maurer C. A., Perez A., Maurhofer O., Ventre G., Bentzen C. L., Niesor E. J., y Dufour J. F. The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer. *Dig Dis Sci* 2004; **49**: 982-9.
- de Kok T. M., van Faassen A., Glinghammar B., Pachén D. M., Eng M., Rafter J. J., Baeten C. G., Engels L. G., y Kleijnans J. C. Bile acid concentrations, cytotoxicity, and pH of fecal water from patients with colorectal adenomas. *Dig Dis Sci* 1999; **44**: 2218-25.

- de Ruijter A. J., van Gennip A. H., Caron H. N., Kemp S., y van Kuilenburg A. B. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; **370**: 737-49.
- Debruyne P. R., Bruyneel E. A., Li X., Zimber A., Gespach C., y Mareel M. M. The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutat Res* 2001; **480-481**: 359-69.
- Decock J., Thirkettle S., Wagstaff L., y Edwards D. R. Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer. *J Cell Mol Med* 2011; **15**: 1254-65.
- Degli Esposti M., y Dive C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 455-61.
- del Mar Barbacid M., Fernandez-Resa P., Buesa J. M., Marquez G., Aracil M., Quesadaand A. R., y Mira E. Expression and purification of human stromelysin 1 and 3 from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* 1998; **13**: 243-50.
- Deryugina E. I., y Quigley J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; **25**: 9-34.
- Deryugina E. I., y Quigley J. P. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1803**: 103-20.
- Desagher S., y Martinou J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 369-77.
- Dokmanovic M., y Marks P. A. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 2005; **96**: 293-304.
- Dubois T., Mira J. P., Feliens D., Solito E., Russo-Marie F., y Oudinet J. P. Annexin V inhibits protein kinase C activity via a mechanism of phospholipid sequestration. *Biochem J* 1998; **330 (Pt 3)**: 1277-82.
- Durai R., Yang W., Gupta S., Seifalian A. M., y Winslet M. C. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *Int J Colorectal Dis* 2005; **20**: 203-20.
- Ewart-Toland A., Briassouli P., de Koning J. P., Mao J. H., Yuan J., Chan F., MacCarthy-Morrogh L., Ponder B. A., Nagase H., Burn J., Ball S., Almeida M., Linardopoulos S., y Balmain A. Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat Genet* 2003; **34**: 403-12.
- Farrelly N., Lee Y. J., Oliver J., Dive C., y Streuli C. H. Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. *J Cell Biol* 1999; **144**: 1337-48.
- Fearon E. R., y Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**: 759-67.
- Fedirko V., Tramacere I., Bagnardi V., Rota M., Scotti L., Islami F., Negri E., Straif K., Romieu I., La Vecchia C., Boffetta P., y Jenab M. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol* 2011; **22**: 1958-72.
- Filipenko N. R., MacLeod T. J., Yoon C. S., y Waisman D. M. Annexin A2 is a novel RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2004; **279**: 8723-31.
- Flower R. J. Background and discovery of lipocortins. *Agents Actions* 1986; **17**: 255-62.
- Folgueras A. R., Pendas A. M., Sanchez L. M., y Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004; **48**: 411-24.

- Fregeau C. J., Helgason C. D., y Bleackley R. C. Two cytotoxic cell proteinase genes are differentially sensitive to sodium butyrate. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 3113-9.
- Frigola J., Sole X., Paz M. F., Moreno V., Esteller M., Capella G., y Peinado M. A. Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 319-26.
- Fung K. Y., Brierley G. V., Henderson S., Hoffmann P., McColl S. R., Lockett T., Head R., y Cosgrove L. Butyrate-induced apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells includes induction of a cell stress response. *J Proteome Res* 2011; **10**: 1860-9.
- Fung K. Y., Lewanowitsch T., Henderson S. T., Priebe I., Hoffmann P., McColl S. R., Lockett T., Head R., y Cosgrove L. J. Proteomic analysis of butyrate effects and loss of butyrate sensitivity in HT29 colorectal cancer cells. *J Proteome Res* 2009; **8**: 1220-7.
- Futter C. E., y White I. J. Annexins and endocytosis. *Traffic* 2007; **8**: 951-8.
- Gavins F. N., Yona S., Kamal A. M., Flower R. J., y Perretti M. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. *Blood* 2003; **101**: 4140-7.
- Genge B. R., Wu L. N., y Wuthier R. E. Kinetic analysis of mineral formation during in vitro modeling of matrix vesicle mineralization: effect of annexin A5, phosphatidylserine, and type II collagen. *Anal Biochem* 2007; **367**: 159-66.
- Gerke V., Creutz C. E., y Moss S. E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 449-61.
- Gerke V., y Moss S. E. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002; **82**: 331-71.
- Ghislat G., Aguado C., y Knecht E. Annexin A5 stimulates autophagy and inhibits endocytosis. *J Cell Sci* 2012; **125**: 92-107.
- Gill R. K., y Christakos S. Identification of sequence elements in mouse calbindin-D28k gene that confer 1,25-dihydroxyvitamin D₃- and butyrate-inducible responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 2984-8.
- Glinghammar B., Inoue H., y Rafter J. J. Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF- κ B and AP-1. *Carcinogenesis* 2002; **23**: 839-45.
- Gloire G., Legrand-Poels S., y Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 2006; **72**: 1493-505.
- Glozak M. A., Sengupta N., Zhang X., y Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005; **363**: 15-23.
- Gonzalez-Rubio S., Linares C. I., Bello R. I., Gonzalez R., Ferrin G., Hidalgo A. B., Munoz-Gomariz E., Rodriguez B. A., Barrera P., Ranchal I., Duran-Prado M., Aguilar-Melero P., De la Mata M., y Muntane J. Calcium-dependent nitric oxide production is involved in the cytoprotective properties of n-acetylcysteine in glycochenodeoxycholic acid-induced cell death in hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; **242**: 165-72.
- Gordon C. T., Fox V. J., Najdovska S., y Perkins A. C. C/EBPdelta and C/EBPgamma bind the CCAAT-box in the human beta-globin promoter and modulate the activity of the CACC-box binding protein, EKLF. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1729**: 74-80.
- Grady W. M. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. *Biochem Soc Trans* 2005; **33**: 684-8.
- Grady W. M., y Carethers J. M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008; **135**: 1079-99.

- Grantab R., Sivananthan S., y Tannock I. F. The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells. *Cancer Res* 2006; **66**: 1033-9.
- Grau A. M., Datta P. K., Zi J., Halder S. K., y Beauchamp R. D. Role of Smad proteins in the regulation of NF-kappaB by TGF-beta in colon cancer cells. *Cell Signal* 2006; **18**: 1041-50.
- Gunter M. J., y Leitzmann M. F. Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *J Nutr Biochem* 2006; **17**: 145-56.
- Guzman-Aranguez A., Olmo N., Turnay J., Lecona E., Perez-Ramos P., Lopez de Silanes I., y Lizarbe M. A. Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem* 2005; **94**: 178-93.
- Ha Y. H., y Park D. G. Effects of DCA on Cell Cycle Proteins in Colonocytes. *J Korean Soc Coloproctol* 2010; **26**: 254-9.
- Haigler H. T., Schlaepfer D. D., y Burgess W. H. Characterization of lipocortin I and an immunologically unrelated 33-kDa protein as epidermal growth factor receptor/kinase substrates and phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* 1987; **262**: 6921-30.
- Halestrap A. P., y Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 2004; **447**: 619-28.
- Hamer H. M., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F. J., y Brummer R. J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; **27**: 104-19.
- Hannon R., Croxtall J. D., Getting S. J., Roviezzo F., Yona S., Paul-Clark M. J., Gavins F. N., Perretti M., Morris J. F., Buckingham J. C., y Flower R. J. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J* 2003; **17**: 253-5.
- Harada K., y Ogden G. R. An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1). *Oral Oncol* 2000; **36**: 3-7.
- Hardman W. E. (n-3) fatty acids and cancer therapy. *J Nutr* 2004; **134**: 3427S-30S.
- Harris D. M., y Go V. L. Vitamin D and colon carcinogenesis. *J Nutr* 2004; **134**: 3463S-71S.
- Harrison S., y Benziger H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *Surgeon* 2011; **9**: 200-10.
- Harvey N. T., y Ruzkiewicz A. Serrated neoplasia of the colorectum. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 3792-8.
- Hayes M. J., Rescher U., Gerke V., y Moss S. E. Annexin-actin interactions. *Traffic* 2004; **5**: 571-6.
- Haza A. I., Glinghammar B., Grandien A., y Rafter J. Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. *Nutr Cancer* 2000; **36**: 79-89.
- He K. L., Sui G., Xiong H., Broekman M. J., Huang B., Marcus A. J., y Hajjar K. A. Feedback regulation of endothelial cell surface plasmin generation by PKC-dependent phosphorylation of annexin A2. *J Biol Chem* 2011; **286**: 15428-39.
- Henderson C., Mizzau M., Paroni G., Maestro R., Schneider C., y Brancolini C. Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Biol Chem* 2003; **278**: 12579-89.

- Herold C., Ganslmayer M., Ocker M., Hermann M., Geerts A., Hahn E. G., y Schuppan D. The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J Hepatol* 2002; **36**: 233-40.
- Hinnebusch B. F., Meng S., Wu J. T., Archer S. Y., y Hodin R. A. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* 2002; **132**: 1012-7.
- Hirose T., Sowa Y., Takahashi S., Saito S., Yasuda C., Shindo N., Furuichi K., y Sakai T. p53-independent induction of Gadd45 by histone deacetylase inhibitor: coordinate regulation by transcription factors Oct-1 and NF-Y. *Oncogene* 2003; **22**: 7762-73.
- Hofmann A. F. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 1999; **159**: 2647-58.
- Hofmann A. F., y Hagey L. R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 2461-83.
- Hofstra L., y Heymans S. Annexin A5 and the failing heart; lost or found in translation? *Eur Heart J* 2007; **28**: 2695-6.
- Hong J., Behar J., Wands J., Resnick M., Wang L. J., DeLellis R. A., Lambeth D., Souza R. F., Spechler S. J., y Cao W. Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 2010; **59**: 170-80.
- Hsiang C. H., Tunoda T., Whang Y. E., Tyson D. R., y Ornstein D. K. The impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells. *Prostate* 2006; **66**: 1413-24.
- Hu N., Flaig M. J., Su H., Shou J. Z., Roth M. J., Li W. J., Wang C., Goldstein A. M., Li G., Emmert-Buck M. R., y Taylor P. R. Comprehensive characterization of annexin I alterations in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 6013-22.
- Huang W., Zhao S., Ammanamanchi S., Brattain M., Venkatasubbarao K., y Freeman J. W. Trichostatin A induces transforming growth factor beta type II receptor promoter activity and acetylation of Sp1 by recruitment of PCAF/p300 to a Sp1.NF-Y complex. *J Biol Chem* 2005; **280**: 10047-54.
- Hung W. C., y Chang H. C. Indole-3-carbinol inhibits Sp1-induced matrix metalloproteinase-2 expression to attenuate migration and invasion of breast cancer cells. *J Agric Food Chem* 2009; **57**: 76-82.
- Hylemon P. B., Zhou H., Pandak W. M., Ren S., Gil G., y Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res* 2009; **50**: 1509-20.
- Iacopetta B., Grieco F., y Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* 2010; **6**: 260-9.
- Imbriano C., Gurtner A., Cocchiarella F., Di Agostino S., Basile V., Gostissa M., Dobbelstein M., Del Sal G., Piaggio G., y Mantovani R. Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 3737-51.
- Jang H., Mason J. B., y Choi S. W. Genetic and epigenetic interactions between folate and aging in carcinogenesis. *J Nutr* 2005; **135**: 2967S-71S.
- Javitt N. B. Cholesterol, hydroxycholesterols, and bile acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **292**: 1147-53.
- Jean-Louis S., Akare S., Ali M. A., Mash E. A., Jr., Meuillet E., y Martinez J. D. Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations. *J Biol Chem* 2006; **281**: 14948-60.
- Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., y Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; **61**: 69-90.

- Jiang D., Ying W., Lu Y., Wan J., Zhai Y., Liu W., Zhu Y., Qiu Z., Qian X., y He F. Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis. *Proteomics* 2003; **3**: 724-37.
- Johnson I. T., y Lund E. K. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; **26**: 161-81.
- Kabe Y., Yamada J., Uga H., Yamaguchi Y., Wada T., y Handa H. NF- κ B is essential for the recruitment of RNA polymerase II and inducible transcription of several CCAAT box-containing genes. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 512-22.
- Kaetzel M. A., Mo Y. D., Mealy T. R., Campos B., Bergsma-Schutter W., Brisson A., Dedman J. R., y Seaton B. A. Phosphorylation mutants elucidate the mechanism of annexin IV-mediated membrane aggregation. *Biochemistry* 2001; **40**: 4192-9.
- Kamal A. M., Smith S. F., De Silva Wijayasinghe M., Solito E., y Corrigan C. J. An annexin 1 (ANXA1)-derived peptide inhibits prototype antigen-driven human T cell Th1 and Th2 responses in vitro. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**: 1116-25.
- Kantari C., y Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1813**: 558-63.
- Karube A., Shidara Y., Hayasaka K., Maki M., y Tanaka T. Suppression of calphobindin I (CPB I) production in carcinoma of uterine cervix and endometrium. *Gynecol Oncol* 1995; **58**: 295-300.
- Kataoka H., Uchino H., Iwamura T., Seiki M., Nabeshima K., y Koono M. Enhanced tumor growth and invasiveness in vivo by a carboxyl-terminal fragment of alpha1-proteinase inhibitor generated by matrix metalloproteinases: a possible modulatory role in natural killer cytotoxicity. *Am J Pathol* 1999; **154**: 457-68.
- Katayama H., Ota T., Jisaki F., Ueda Y., Tanaka T., Odashima S., Suzuki F., Terada Y., y Tatsuka M. Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1160-2.
- Katona B. W., Anant S., Covey D. F., y Stenson W. F. Characterization of enantiomeric bile acid-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *J Biol Chem* 2009; **284**: 3354-64.
- Kawamata Y., Fujii R., Hosoya M., Harada M., Yoshida H., Miwa M., Fukusumi S., Habata Y., Itoh T., Shintani Y., Hinuma S., Fujisawa Y., y Fujino M. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003; **278**: 9435-40.
- Kenis H., van Genderen H., Deckers N. M., Lux P. A., Hofstra L., Narula J., y Reutelingsperger C. P. Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp Cell Res* 2006; **312**: 719-26.
- Kessenbrock K., Plaks V., y Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; **141**: 52-67.
- Khan N., Afaq F., y Mukhtar H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett* 2010; **293**: 133-43.
- Khan S. N., y Khan A. U. Role of histone acetylation in cell physiology and diseases: An update. *Clin Chim Acta* 2010; **411**: 1401-11.
- Kim M. S., Lee J., y Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2010; **29**: 181-206.
- Kim Y. S., Ko J., Kim I. S., Jang S. W., Sung H. J., Lee H. J., Lee S. Y., Kim Y., y Na D. S. PKC δ -dependent cleavage and nuclear translocation of annexin A1 by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Eur J Biochem* 2003; **270**: 4089-94.
- Kim Y. S., y Milner J. A. Dietary modulation of colon cancer risk. *J Nutr* 2007; **137**: 2576S-9S.

- Klee M., Pallauf K., Alcala S., Fleischer A., y Pimentel-Muinos F. X. Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *EMBO J* 2009; **28**: 1757-68.
- Klein T., y Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011; **41**: 271-90.
- Knights C. D., Catania J., Di Giovanni S., Muratoglu S., Perez R., Swartzbeck A., Quong A. A., Zhang X., Beerman T., Pestell R. G., y Avantiaggiati M. L. Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* 2006; **173**: 533-44.
- Komninou D., Ayonote A., Richie J. P., Jr., y Rigas B. Insulin resistance and its contribution to colon carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; **228**: 396-405.
- Kondo Y., y Issa J. P. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; **23**: 29-39.
- Koop I., Schindler M., Bosshammer A., Scheibner J., Stange E., y Koop H. Physiological control of cholecystokinin release and pancreatic enzyme secretion by intraduodenal bile acids. *Gut* 1996; **39**: 661-7.
- Koradi R., Billeter M., y Wüthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 1996; **14**(1):51-5, 29-32.
- Kroboth K., Newton I. P., Kita K., Dikovskaya D., Zumbrunn J., Waterman-Storer C. M., y Nathke I. S. Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 910-8.
- Kure S., Noshio K., Baba Y., Irahara N., Shima K., Ng K., Meyerhardt J. A., Giovannucci E. L., Fuchs C. S., y Ogino S. Vitamin D receptor expression is associated with PIK3CA and KRAS mutations in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; **18**: 2765-72.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-5.
- Lampropoulos P., Zizi-Sermpetzoglou A., Rizos S., Kostakis A., Nikiteas N., y Papavassiliou A. G. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 2012; **314**: 1-7.
- Lau B. W., Colella M., Ruder W. C., Ranieri M., Curci S., y Hofer A. M. Deoxycholic acid activates protein kinase C and phospholipase C via increased Ca²⁺ entry at plasma membrane. *Gastroenterology* 2005; **128**: 695-707.
- Lavin M. F., y Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 941-50.
- Law A. L., Ling Q., Hajjar K. A., Futter C. E., Greenwood J., Adamson P., Wavre-Shapton S. T., Moss S. E., y Hayes M. J. Annexin A2 regulates phagocytosis of photoreceptor outer segments in the mouse retina. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 3896-904.
- Leary R. J., Lin J. C., Cummins J., Boca S., Wood L. D., Parsons D. W., Jones S., Sjoblom T., Park B. H., Parsons R., Willis J., Dawson D., Willson J. K., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Kopelovich L., Papadopoulos N., Pennacchio L. A., Wang T. L., Markowitz S. D., Parmigiani G., Kinzler K. W., Vogelstein B., y Velculescu V. E. Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 16224-9.

- Levi E., Fridman R., Miao H. Q., Ma Y. S., Yayon A., y Vlodavsky I. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 7069-74.
- Li F., Cao Y., Townsend C. M., Jr., y Ko T. C. TGF-beta signaling in colon cancer cells. *World J Surg* 2005; **29**: 306-11.
- Li J., Mizukami Y., Zhang X., Jo W. S., y Chung D. C. Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3beta. *Gastroenterology* 2005; **128**: 1907-18.
- Lim L. H., y Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J* 2007; **21**: 968-75.
- Liu J., Zhu X., Myo S., Lambertino A. T., Xu C., Boetticher E., Munoz N. M., Sano M., Cordoba M., Learoyd J., Meliton A., Johnson M., y Leff A. R. Glucocorticoid-induced surface expression of annexin 1 blocks beta2-integrin adhesion of human eosinophils to intercellular adhesion molecule 1 surrogate protein. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **115**: 493-500.
- Loktionov A. Cell exfoliation in the human colon: myth, reality and implications for colorectal cancer screening. *Int J Cancer* 2007; **120**: 2281-9.
- Longpre J. M., y Loo G. Protection of human colon epithelial cells against deoxycholate by rottlerin. *Apoptosis* 2008; **13**: 1162-71.
- Looby E., Long A., Kelleher D., y Volkov Y. Bile acid deoxycholate induces differential subcellular localisation of the PKC isoenzymes beta 1, epsilon and delta in colonic epithelial cells in a sodium butyrate insensitive manner. *Int J Cancer* 2005; **114**: 887-95.
- Lopez-Conejo T., Olmo N., Turnay J., Navarro J., y Lizarbe A. Characterization of tumorigenic sub-lines from a poorly tumorigenic human colon-adenocarcinoma cell line. *Int J Cancer* 1996; **67**: 668-75.
- Lopez de Silanes I., Olmo N., Turnay J., Gonzalez de Buitrago G., Perez-Ramos P., Guzman-Aranguez A., Garcia-Diez M., Lecona E., Gorospe M., y Lizarbe M. A. Acquisition of resistance to butyrate enhances survival after stress and induces malignancy of human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 4593-600.
- Ludwig M. G., Basset P., y Anglard P. Multiple regulatory elements in the murine stromelysin-3 promoter. Evidence for direct control by CCAAT/enhancer-binding protein beta and thyroid and retinoid receptors. *J Biol Chem* 2000; **275**: 39981-90.
- Luecke H., Chang B. T., Mailliard W. S., Schlaepfer D. D., y Haigler H. T. Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. *Nature* 1995; **378**: 512-5.
- Luo D., Guerin E., Ludwig M. G., Stoll I., Basset P., y Anglard P. Transcriptional induction of stromelysin-3 in mesodermal cells is mediated by an upstream CCAAT/enhancer-binding protein element associated with a DNase I-hypersensitive site. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37177-85.
- Luo D., Mari B., Stoll I., y Anglard P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 2002; **277**: 25527-36.
- Luo H., Yang Y., Huang F., Li F., Jiang Q., Shi K., y Xu C. Selenite induces apoptosis in colorectal cancer cells via AKT-mediated inhibition of beta-catenin survival axis. *Cancer Lett* 2012; **315**: 78-85.
- Lupton J. R. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr* 2004; **134**: 479-82.

- Ma X., Ezzeldin H. H., y Diasio R. B. Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials. *Drugs* 2009; **69**: 1911-34.
- Mahmood Z., y Shukla Y. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 2010; **316**: 887-99.
- Malo M. S., Mozumder M., Zhang X. B., Biswas S., Chen A., Bai L. C., Merchant J. L., y Hodin R. A. Intestinal alkaline phosphatase gene expression is activated by ZBP-89. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**: G737-46.
- Manes S., Mira E., Barbacid M. M., Cipres A., Fernandez-Resa P., Buesa J. M., Merida I., Aracil M., Marquez G., y Martinez A. C. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25706-12.
- Manni I., Mazzaro G., Gurtner A., Mantovani R., Haugwitz U., Krause K., Engeland K., Sacchi A., Soddu S., y Piaggio G. NF-Y mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2, and cdc25C promoters upon induced G2 arrest. *J Biol Chem* 2001; **276**: 5570-6.
- Mantovani R. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 1999; **239**: 15-27.
- Maran R. R., Thomas A., Roth M., Sheng Z., Esterly N., Pinson D., Gao X., Zhang Y., Ganapathy V., Gonzalez F. J., y Guo G. L. Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; **328**: 469-77.
- Marchetti C., Migliorati G., Moraca R., Riccardi C., Nicoletti I., Fabiani R., Mastrandrea V., y Morozzi G. Deoxycholic acid and SCFA-induced apoptosis in the human tumor cell-line HT-29 and possible mechanisms. *Cancer Lett* 1997; **114**: 97-9.
- Mari B. P., Anderson I. C., Mari S. E., Ning Y., Lutz Y., Kobzik L., y Shipp M. A. Stromelysin-3 is induced in tumor/stroma cocultures and inactivated via a tumor-specific and basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1998; **273**: 618-26.
- Mariadason J. M., Corner G. A., y Augenlicht L. H. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res* 2000; **60**: 4561-72.
- Mariadason J. M., Velcich A., Wilson A. J., Augenlicht L. H., y Gibson P. R. Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. *Gastroenterology* 2001; **120**: 889-99.
- Marks P. A., Miller T., y Richon V. M. Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* 2003; **3**: 344-51.
- Marmorstein R., y Roth S. Y. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* 2001; **11**: 155-61.
- Marmorstein R., y Trievel R. C. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1789**: 58-68.
- Martin M. D., y Matrisian L. M. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2007; **26**: 717-24.
- Marutani M., Tonoki H., Tada M., Takahashi M., Kashiwazaki H., Hida Y., Hamada J., Asaka M., y Moriuchi T. Dominant-negative mutations of the tumor suppressor p53 relating to early onset of glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1999; **59**: 4765-9.

- Marzio G., Wagener C., Gutierrez M. I., Cartwright P., Helin K., y Giacca M. E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 10887-92.
- Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008; **134**: 215-30.
- Meek D. W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 714-23.
- Meek D. W., y Anderson C. W. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **1**: a000950.
- Mellert H. S., y McMahon S. B. Biochemical pathways that regulate acetyltransferase and deacetylase activity in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 2009; **34**: 571-8.
- Mellor J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet* 2006; **22**: 320-9.
- Merchant J. L., Bai L., y Okada M. ZBP-89 mediates butyrate regulation of gene expression. *J Nutr* 2003; **133**: 2456S-60S.
- Migliore L., Migheli F., Spisni R., y Coppede F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 792362.
- Milovic V., Teller I. C., Faust D., Caspary W. F., y Stein J. Effects of deoxycholate on human colon cancer cells: apoptosis or proliferation. *Eur J Clin Invest* 2002; **32**: 29-34.
- Minghetti L., Nicolini A., Polazzi E., Greco A., Perretti M., Parente L., y Levi G. Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. *Br J Pharmacol* 1999; **126**: 1307-14.
- Minucci S., y Pelicci P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 38-51.
- Mishra L., Shetty K., Tang Y., Stuart A., y Byers S. W. The role of TGF-beta and Wnt signaling in gastrointestinal stem cells and cancer. *Oncogene* 2005; **24**: 5775-89.
- Mitsiades N., Yu W. H., Poulaki V., Tsokos M., y Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 2001; **61**: 577-81.
- Miwa N., Uebi T., y Kawamura S. S100-annexin complexes--biology of conditional association. *FEBS J* 2008; **275**: 4945-55.
- Modica S., Murzilli S., Salvatore L., Schmidt D. R., y Moschetta A. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 2008; **68**: 9589-94.
- Mohiti J., Caswell A. M., y Walker J. H. The nuclear location of annexin V in the human osteosarcoma cell line MG-63 depends on serum factors and tyrosine kinase signaling pathways. *Exp Cell Res* 1997; **234**: 98-104.
- Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 2004; **28**: 101-5.
- Monceau V., Belikova Y., Kratassiouk G., Charue D., Camors E., Communal C., Trouve P., Russo-Marie F., y Charlemagne D. Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2004; **64**: 496-506.
- Monneret C. Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2005; **40**: 1-13.
- Monte M. J., Marin J. J., Antelo A., y Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 804-16.
- Morel E., Parton R. G., y Gruenberg J. Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell* 2009; **16**: 445-57.
- Morgan M. J., y Liu Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 2011; **21**: 103-15.

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63.
- Moss S. E., y Morgan R. O. The annexins. *Genome Biol* 2004; **5**: 219.
- Motrescu E. R., Blaise S., Etique N., Messaddeq N., Chenard M. P., Stoll I., Tomasetto C., y Rio M. C. Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene* 2008; **27**: 6347-55.
- Mu D., Cambier S., Fjellbirkeland L., Baron J. L., Munger J. S., Kawakatsu H., Sheppard D., Broaddus V. C., y Nishimura S. L. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol* 2002; **157**: 493-507.
- Murphy G., y Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008; **29**: 290-308.
- Nakano K., Mizuno T., Sowa Y., Orita T., Yoshino T., Okuyama Y., Fujita T., Ohtani-Fujita N., Matsukawa Y., Tokino T., Yamagishi H., Oka T., Nomura H., y Sakai T. Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *J Biol Chem* 1997; **272**: 22199-206.
- Nathke I. APC at a glance. *J Cell Sci* 2004; **117**: 4873-5.
- Navarro J. M., Olmo N., Turnay J., Lopez-Conejo M. T., y Lizarbe M. A. Differentiation of BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells by sodium butyrate: increase in 5'-nucleotidase activity. *Eur J Clin Invest* 1997; **27**: 620-8.
- Noel A., Boulay A., Kebers F., Kannan R., Hajitou A., Calberg-Bacq C. M., Basset P., Rio M. C., y Foidart J. M. Demonstration in vivo that stromelysin-3 functions through its proteolytic activity. *Oncogene* 2000; **19**: 1605-12.
- Noel A. C., Lefebvre O., Maquoi E., VanHoorde L., Chenard M. P., Mareel M., Foidart J. M., Basset P., y Rio M. C. Stromelysin-3 expression promotes tumor take in nude mice. *J Clin Invest* 1996; **97**: 1924-30.
- Olmo N., Turnay J., Lecona E., Garcia-Diez M., Llorente B., Santiago-Gomez A., y Lizarbe M. A. Acquisition of resistance to butyrate induces resistance to luminal components and other types of stress in human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 2007; **21**: 254-61.
- Olmo N., Turnay J., Perez-Ramos P., Lecona E., Barrasa J. I., Lopez de Silanes I., y Lizarbe M. A. In vitro models for the study of the effect of butyrate on human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 2007; **21**: 262-70.
- Ow Y. P., Green D. R., Hao Z., y Mak T. W. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 532-42.
- Pai R., Tarnawski A. S., y Tran T. Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 2156-63.
- Pajak B., Orzechowski A., y Gajkowska B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci* 2007; **52**: 83-8.
- Palmeira C. M., y Rolo A. P. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology* 2004; **203**: 1-15.
- Parente L., y Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res* 2004; **53**: 125-32.
- Parone P. A., James D., y Martinou J. C. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 2002; **84**: 105-11.
- Patel D. M., Ahmad S. F., Weiss D. G., Gerke V., y Kuznetsov S. A. Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. *J Cell Sci* 2011; **124**: 578-88.

- Patel P., Nankova B. B., y LaGamma E. F. Butyrate, a gut-derived environmental signal, regulates tyrosine hydroxylase gene expression via a novel promoter element. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; **160**: 53-62.
- Patton K. T., Chen H. M., Joseph L., y Yang X. J. Decreased annexin I expression in prostatic adenocarcinoma and in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Histopathology* 2005; **47**: 597-601.
- Payne C. M., Crowley-Weber C. L., Dvorak K., Bernstein C., Bernstein H., Holubec H., Crowley C., y Garewal H. Mitochondrial perturbation attenuates bile acid-induced cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 2005; **21**: 215-31.
- Payne C. M., Weber C., Crowley-Skillicorn C., Dvorak K., Bernstein H., Bernstein C., Holubec H., Dvorakova B., y Garewal H. Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis* 2007; **28**: 215-22.
- Pei D., y Weiss S. J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995; **375**: 244-7.
- Perczel A., Hollosi M., Tusnady G., y Fasman G. D. Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. *Protein Eng* 1991; **4**: 669-79.
- Perdiz D., Mackeh R., Pous C., y Baillet A. The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal* 2011; **23**: 763-71.
- Perez-Ramos P., Olmo N., Turnay J., Lecona E., de Buitrago G. G., Portoles M. T., y Lizarbe M. A. Effect of bile acids on butyrate-sensitive and -resistant human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer* 2005; **53**: 208-19.
- Perretti M., y D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 62-70.
- Perretti M., Getting S. J., Solito E., Murphy P. M., y Gao J. L. Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. *Am J Pathol* 2001; **158**: 1969-73.
- Peserico A., y Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 371832.
- Peterson C. L., y Laniel M. A. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004; **14**: R546-51.
- Phan C. T., y Tso P. Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci* 2001; **6**: D299-319.
- Philip J. G., John C. D., Cover P. O., Morris J. F., Christian H. C., Flower R. J., y Buckingham J. C. Opposing influences of glucocorticoids and interleukin-1beta on the secretion of growth hormone and ACTH in the rat in vivo: role of hypothalamic annexin 1. *Br J Pharmacol* 2001; **134**: 887-95.
- Pino M. S., y Chung D. C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; **138**: 2059-72.
- Pinto D., y Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* 2005; **306**: 357-63.
- Pittis M. G., Muzzolin L., Giulianini P. G., y Garcia R. C. Mycobacteria-containing phagosomes associate less annexins I, VI, VII and XI, but not II, concomitantly with a diminished phagolysosomal fusion. *Eur J Cell Biol* 2003; **82**: 9-17.
- Pollock C. B., Shirasawa S., Sasazuki T., Kolch W., y Dhillon A. S. Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 1244-50.
- Powell A. A., Akare S., Qi W., Herzer P., Jean-Louis S., Feldman R. A., y Martinez J. D. Resistance to ursodeoxycholic acid-induced growth arrest can also result in

- resistance to deoxycholic acid-induced apoptosis and increased tumorigenicity. *BMC Cancer* 2006; **6**: 219.
- Powolny A., Xu J., y Loo G. Deoxycholate induces DNA damage and apoptosis in human colon epithelial cells expressing either mutant or wild-type p53. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; **33**: 193-203.
- Pretlow T. P., y Pretlow T. G. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta* 2005; **1756**: 83-96.
- Qiao D., Gaitonde S. V., Qi W., y Martinez J. D. Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 2001; **22**: 957-64.
- Qiao D., Im E., Qi W., y Martinez J. D. Activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein mediated GADD153 expression is involved in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1583**: 108-16.
- Qiao D., Stratagouleas E. D., y Martinez J. D. Activation and role of mitogen-activated protein kinases in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 2001; **22**: 35-41.
- Qiao L., Han S. I., Fang Y., Park J. S., Gupta S., Gilfor D., Amorino G., Valerie K., Sealy L., Engelhardt J. F., Grant S., Hylemon P. B., y Dent P. Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 3052-66.
- Quivy V., y Van Lint C. Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol* 2004; **68**: 1221-9.
- Rand J. H. Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2000; **15**: 107-11.
- Rasheva V. I., y Domingos P. M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; **14**: 996-1007.
- Reddy B. S. Dietary fibre and colon cancer: epidemiologic and experimental evidence. *Can Med Assoc J* 1980; **123**: 850-6.
- Reddy B. S. Diet and excretion of bile acids. *Cancer Res* 1981; **41**: 3766-8.
- Redlak M. J., y Miller T. A. Targeting PI3K/Akt/HSP90 signaling sensitizes gastric cancer cells to deoxycholate-induced apoptosis. *Dig Dis Sci* 2011; **56**: 323-9.
- Redondo-Munoz J., Ugarte-Berzal E., Terol M. J., Van den Steen P. E., Hernandez del Cerro M., Roderfeld M., Roeb E., Opdenakker G., Garcia-Marco J. A., y Garcia-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* 2010; **17**: 160-72.
- Reinehr R., Becker S., Keitel V., Eberle A., Grether-Beck S., y Haussinger D. Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology* 2005; **129**: 2009-31.
- Rescher U., y Gerke V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2631-9.
- Rescher U., Ludwig C., Konietzko V., Kharitononkov A., y Gerke V. Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *J Cell Sci* 2008; **121**: 2177-85.
- Riedl S. J., y Salvesen G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 405-13.
- Rio M. C. From a unique cell to metastasis is a long way to go: clues to stromelysin-3 participation. *Biochimie* 2005; **87**: 299-306.

- Ritchie R. H., Gordon J. M., Woodman O. L., Cao A. H., y Dusting G. J. Annexin-1 peptide Anx-1(2-26) protects adult rat cardiac myocytes from cellular injury induced by simulated ischaemia. *Br J Pharmacol* 2005; **145**: 495-502.
- Rodrigo J. P., Garcia-Pedrero J. M., Gonzalez M. V., Fernandez M. P., Suarez C., y Herrero A. Expression of annexin A1 in normal and chronically inflamed nasal mucosa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; **130**: 211-5.
- Roediger W. E. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 1982; **83**: 424-9.
- Rosengarth A., Gerke V., y Luecke H. X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. *J Mol Biol* 2001; **306**(3):489-98.
- Rosignoli P., Fabiani R., De Bartolomeo A., Fuccelli R., Pelli M. A., y Morozzi G. Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur J Nutr* 2008; **47**: 301-9.
- Russell D. W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 2003; **72**: 137-74.
- Sansom O. J., Reed K. R., Hayes A. J., Ireland H., Brinkmann H., Newton I. P., Batlle E., Simon-Assmann P., Clevers H., Nathke I. S., Clarke A. R., y Winton D. J. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 2004; **18**: 1385-90.
- Saso L., Grippa E., Gatto M. T., y Silvestrini B. Inhibition of calcium oxalate precipitation by bile salts. *Int J Urol* 2001; **8**: 124-7.
- Satoh A., Suzuki K., Takayama E., Kojima K., Hidaka T., Kawakami M., Matsumoto I., y Ohsuzu F. Detection of anti-annexin IV and V antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999; **26**: 1715-20.
- Scharlau D., Borowicki A., Habermann N., Hofmann T., Klenow S., Miene C., Munjal U., Stein K., y Gleit M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* 2009; **682**: 39-53.
- Schlaepfer D. D., y Haigler H. T. Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. *J Biol Chem* 1987; **262**: 6931-7.
- Schlottman K., Wachs F. P., Krieg R. C., Kullmann F., Scholmerich J., y Rogler G. Characterization of bile salt-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *Cancer Res* 2000; **60**: 4270-6.
- Schroy P. C., Rustgi A. K., Ikonomu E., Liu X. P., Polito J., Andry C., y O'Keane J. C. Growth and intestinal differentiation are independently regulated in HT29 colon cancer cells. *J Cell Physiol* 1994; **161**: 111-23.
- Schultz D. R., y Harrington W. J., Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 2003; **32**: 345-69.
- Shant J., Cheng K., Marasa B. S., Wang J. Y., y Raufman J. P. Akt-dependent NF-kappaB activation is required for bile acids to rescue colon cancer cells from stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2009; **315**: 432-50.
- Shen D., Chang H. R., Chen Z., He J., Lonsberry V., Elshimali Y., Chia D., Seligson D., Goodglick L., Nelson S. F., y Gornbein J. A. Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high-throughput analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **326**: 218-27.
- Sheu B. C., Hsu S. M., Ho H. N., Lien H. C., Huang S. C., y Lin R. H. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001; **61**: 237-42.

- Singh B. N., Zhang G., Hwa Y. L., Li J., Dowdy S. C., y Jiang S. W. Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; **10**: 935-54.
- Skouteris G. G., y Schroder C. H. The hepatocyte growth factor receptor kinase-mediated phosphorylation of lipocortin-1 transduces the proliferating signal of the hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 27266-73.
- Slattery M. L., Edwards S., Curtin K., Ma K., Edwards R., Holubkov R., y Schaffer D. Physical activity and colorectal cancer. *Am J Epidemiol* 2003; **158**: 214-24.
- Snover D. C. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2011; **42**: 1-10.
- Solito E., de Coupade C., Canaider S., Goulding N. J., y Perretti M. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol* 2001; **133**: 217-28.
- Sopkova J., Vincent M., Takahashi M., Lewit-Bentley A., y Gallay J. Conformational flexibility of domain III of annexin V at membrane/water interfaces. *Biochemistry* 1999; **38**: 5447-58.
- Spange S., Wagner T., Heinzl T., y Kramer O. H. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; **41**: 185-98.
- Srinivas S. R., Gopal E., Zhuang L., Itagaki S., Martin P. M., Fei Y. J., Ganapathy V., y Prasad P. D. Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem J* 2005; **392**: 655-64.
- Sroka I. C., Nagle R. B., y Bowden G. T. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase is regulated by sp1 through the differential activation of AKT, JNK, and ERK pathways in human prostate tumor cells. *Neoplasia* 2007; **9**: 406-17.
- St-Pierre M. V., Kullak-Ublick G. A., Hagenbuch B., y Meier P. J. Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J Exp Biol* 2001; **204**: 1673-86.
- Stadler J., Stern H. S., Yeung K. S., McGuire V., Furrer R., Marcon N., y Bruce W. R. Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids. *Gut* 1988; **29**: 1326-31.
- Swairjo M.A., Concha N.O., Kaetzel M.A., Dedman J.R., y Seaton B.A. Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat Struct Biol* 1995; **2**(11): 968-74.
- Sykes S. M., Stanek T. J., Frank A., Murphy M. E., y McMahon S. B. Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *J Biol Chem* 2009; **284**: 20197-205.
- Szegezdi E., Logue S. E., Gorman A. M., y Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; **7**: 880-5.
- Tan J., Cang S., Ma Y., Petrillo R. L., y Liu D. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* 2010; **3**: 5.
- Tannapfel A., Neid M., Aust D., y Baretton G. The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Dtsch Arztebl Int* 2010; **107**: 760-6.
- Taylor A. D., Cowell A. M., Flower R. J., y Buckingham J. C. Dexamethasone suppresses the release of prolactin from the rat anterior pituitary gland by lipocortin 1 dependent and independent mechanisms. *Neuroendocrinology* 1995; **62**: 530-42.

- Teodoridis J. M., Hardie C., y Brown R. CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer Lett* 2008; **268**: 177-86.
- Thibault R., Blachier F., Darcy-Vrillon B., de Coppet P., Bourreille A., y Segain J. P. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency. *Inflamm Bowel Dis* 2010; **16**: 684-95.
- Towbin H., Staehelin T., y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 4350-4.
- Tse C., Shoemaker A. R., Adickes J., Anderson M. G., Chen J., Jin S., Johnson E. F., Marsh K. C., Mitten M. J., Nimmer P., Roberts L., Tahir S. K., Xiao Y., Yang X., Zhang H., Fesik S., Rosenberg S. H., y Elmore S. W. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008; **68**: 3421-8.
- Tu A. W., y Luo K. Acetylation of Smad2 by the co-activator p300 regulates activin and transforming growth factor beta response. *J Biol Chem* 2007; **282**: 21187-96.
- Turnay J., Guzman-Aranguez A., Lecona E., Barrasa J. I., Olmo N., y Lizarbe M. A. Key role of the N-terminus of chicken annexin A5 in vesicle aggregation. *Protein Sci* 2009; **18**: 1095-106.
- Turnay J., Olmo N., Gasset M., Iloro I., Arrondo J. L., y Lizarbe M. A. Calcium-dependent conformational rearrangements and protein stability in chicken annexin A5. *Biophys J* 2002; **83**: 2280-91.
- Turnay J., Olmo N., Gavilanes J. G., Benitez J., y Lizarbe M. A. Establishment and characterization of a new human colon adenocarcinoma cell line: BCS-TC2. *Cytotechnology* 1990; **3**: 75-88.
- Turnay J., Pfannmuller E., Lizarbe M. A., Bertling W. M., y von der Mark K. Collagen binding activity of recombinant and N-terminally modified annexin V (anchurin CII). *J Cell Biochem* 1995; **58**: 208-20.
- Tzima E., Trotter P. J., Orchard M. A., y Walker J. H. Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 4720-30.
- van der Flier L. G., y Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009; **71**: 241-60.
- Vaneckova I., Vylitova-Pletichova M., Beskid S., Zicha J., y Pacha J. Intracellular pH regulation in colonocytes of rat proximal colon. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1536**: 103-15.
- Vanhoutvin S. A., Troost F. J., Hamer H. M., Lindsey P. J., Koek G. H., Jonkers D. M., Kodde A., Venema K., y Brummer R. J. Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PLoS One* 2009; **4**: e6759.
- Vilar E., y Gruber S. B. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; **7**: 153-62.
- Villar-Garea A., y Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* 2004; **112**: 171-8.
- Vincenti M. P., y Brinckerhoff C. E. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* 2007; **213**: 355-64.
- von Engelhardt W., Gros G., Burmester M., Hansen K., Becker G., y Rechkemmer G. Functional role of bicarbonate in propionate transport across guinea-pig isolated caecum and proximal colon. *J Physiol* 1994; **477** (Pt 2): 365-71.
- Wachs F. P., Krieg R. C., Rodrigues C. M., Messmann H., Kullmann F., Knuchel-Clarke R., Scholmerich J., Rogler G., y Schlottmann K. Bile salt-induced apoptosis in human colon cancer cell lines involves the mitochondrial

- transmembrane potential but not the CD95 (Fas/Apo-1) receptor. *Int J Colorectal Dis* 2005; **20**: 103-13.
- Walker G. E., Wilson E. M., Powell D., y Oh Y. Butyrate, a histone deacetylase inhibitor, activates the human IGF binding protein-3 promoter in breast cancer cells: molecular mechanism involves an Sp1/Sp3 multiprotein complex. *Endocrinology* 2001; **142**: 3817-27.
- Washo-Stultz D., Crowley-Weber C. L., Dvorakova K., Bernstein C., Bernstein H., Kunke K., Waltmire C. N., Garewal H., y Payne C. M. Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2002; **177**: 129-44.
- Wehder L., Arndt S., Murzik U., Bosserhoff A. K., Kob R., von Eggeling F., y Melle C. Annexin A5 is involved in migration and invasion of oral carcinoma. *Cell Cycle* 2009; **8**: 1552-8.
- Wei L., y Shi Y. B. Matrix metalloproteinase stromelysin-3 in development and pathogenesis. *Histol Histopathol* 2005; **20**: 177-85.
- Weng X., Luecke H., Song I. S., Kang D. S., Kim S. H., y Huber R. Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci* 1993; **2**: 448-58.
- White I. J., Bailey L. M., Aghakhani M. R., Moss S. E., y Futter C. E. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J* 2006; **25**: 1-12.
- Wilson A. J., Byun D. S., Popova N., Murray L. B., L'Italien K., Sowa Y., Arango D., Velcich A., Augenlicht L. H., y Mariadason J. M. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 2006; **281**: 13548-58.
- Witt O., Deubzer H. E., Milde T., y Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 2009; **277**: 8-21.
- Wood L. D., Parsons D. W., Jones S., Lin J., Sjoblom T., Leary R. J., Shen D., Boca S. M., Barber T., Ptak J., Silliman N., Szabo S., Dezso Z., Ustyansky V., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Karchin R., Wilson P. A., Kaminker J. S., Zhang Z., Croshaw R., Willis J., Dawson D., Shipitsin M., Willson J. K., Sukumar S., Polyak K., Park B. H., Pethiyagoda C. L., Pant P. V., Ballinger D. G., Sparks A. B., Hartigan J., Smith D. R., Suh E., Papadopoulos N., Buckhaults P., Markowitz S. D., Parmigiani G., Kinzler K. W., Velculescu V. E., y Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; **318**: 1108-13.
- Worthley D. L., Whitehall V. L., Spring K. J., y Leggett B. A. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 3784-91.
- Wu W., Tang X., Hu W., Lotan R., Hong W. K., y Mao L. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exp Metastasis* 2002; **19**: 319-26.
- Wu Y. L., Jiang X. R., Lillington D. M., Newland A. C., y Kelsey S. M. Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance. *Br J Haematol* 2000; **111**: 807-16.
- Xiao H., Hasegawa T., y Isobe K. p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. *J Biol Chem* 2000; **275**: 1371-6.

- Xue G., Hao L. Q., Ding F. X., Mei Q., Huang J. J., Fu C. G., Yan H. L., y Sun S. H. Expression of annexin a5 is associated with higher tumor stage and poor prognosis in colorectal adenocarcinomas. *J Clin Gastroenterol* 2009; **43**: 831-7.
- Yabuuchi H., Tamai I., Sai Y., y Tsuji A. Possible role of anion exchanger AE2 as the intestinal monocarboxylic acid/anion antiporter. *Pharm Res* 1998; **15**: 411-6.
- Yan C., y Boyd D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007; **211**: 19-26.
- Yang Y. H., Deng H., Li W. M., Zhang Q. Y., Hu X. T., Xiao B., Zhu H. H., Geng P. L., y Lu Y. Y. Identification of matrix metalloproteinase 11 as a predictive tumor marker in serum based on gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 74-81.
- Yao Y. L., y Yang W. M. Beyond histone and deacetylase: an overview of cytoplasmic histone deacetylases and their nonhistone substrates. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 146493.
- Yasuda H., Hirata S., Inoue K., Mashima H., Ohnishi H., y Yoshida M. Involvement of membrane-type bile acid receptor M-BAR/TGR5 in bile acid-induced activation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinases in gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **354**: 154-9.
- Yeung T. M., Chia L. A., Kosinski C. M., y Kuo C. J. Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**: 2513-23.
- Yu Q., y Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; **14**: 163-76.
- Yui S., Kanamoto R., y Saeki T. Deoxycholic acid can induce apoptosis in the human colon cancer cell line HCT116 in the absence of Bax. *Nutr Cancer* 2008; **60**: 91-6.
- Yui S., Saeki T., Kanamoto R., y Iwami K. Characteristics of apoptosis in HCT116 colon cancer cells induced by deoxycholic acid. *J Biochem* 2005; **138**: 151-7.
- Yun J., Chae H. D., Choi T. S., Kim E. H., Bang Y. J., Chung J., Choi K. S., Mantovani R., y Shin D. Y. Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway. *J Biol Chem* 2003; **278**: 36966-72.
- Zhang X., Diab I. H., y Zehner Z. E. ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 2900-14.
- Zheng Z. Y., Bernstein H., Bernstein C., Payne C. M., Martinez J. D., y Gerner E. W. Bile acid activation of the gadd153 promoter and of p53-independent apoptosis: relevance to colon cancer. *Cell Death Differ* 1996; **3**: 407-14.
- Zhou J., Liu M., Zhai Y., y Xie W. The antiapoptotic role of pregnane X receptor in human colon cancer cells. *Mol Endocrinol* 2008; **22**: 868-80.
- Zhu F., Xu C., Jiang Z., Jin M., Wang L., Zeng S., Teng L., y Cao J. Nuclear localization of annexin A1 correlates with advanced disease and peritoneal dissemination in patients with gastric carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; **293**: 1310-4.
- Zhu P., Martin E., Mengwasser J., Schlag P., Janssen K. P., y Gottlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004; **5**: 455-63.
- Zilfou J. T., y Lowe S. W. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **1**: a001883.